

**ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS Y ANTIOXIDANTE DE
DERIVADOS DE ÁCIDO CAFEICO EN *Tithonia diversifolia*, Y
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS REGIOISÓMEROS
SINTÉTICOS ANÁLOGOS DE ACHYROFURANO EN *Achyrocline
satureoides***

KRISS DAYANA PANTOJA PULIDO, Qca.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA 2017**

**ACTIVIDAD INSECTICIDA DE EXTRACTOS Y ANTIOXIDANTE DE
DERIVADOS DE ÁCIDO CAFEICO EN *Tithonia diversifolia*, Y
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS REGIOISÓMEROS
SINTÉTICOS ANÁLOGOS DE ACHYROFURANO EN *Achyrocline
satureoides***

KRISS DAYANA PANTOJA PULIDO, Qca.

Tesis presentada como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias-Química

Director:

ANA JULIA COLMENARES DE VELEZ, Ph. D.

Co-Director:

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA MARTÍNEZ, Ph. D.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA 2017**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle y a COLCIENCIAS (mediante la Beca Doctoral No.567) por el soporte financiero.

A la Universidad de La Laguna y al Instituto de Bio-Orgánica Antonio González especialmente a la Dra. Ana Estévez Braun por permitirme realizar mi pasantía doctoral en su grupo de investigación.

Al Dr. José Hipólito Isaza y Dra. Ana Julia Colmenares por la dirección de mi trabajo doctoral, sus enseñanzas tanto académicas como personales.

A los Doctores: Braulio Insuasty, Juan David Guzmán y Armando Ariza por aceptar y participar en la evaluación de mi tesis doctoral.

A los integrantes del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Alimentos por los momentos compartidos.

A Carmen Romero Castro y Pedro Luis De La Torre, por el acompañamiento y valiosos aportes en mi tesis doctoral.

A Yeray Alexai Rodríguez y a la Dra. Margarita Gutiérrez de la Universidad de Talca, Chile, por los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa.

Al grupo de investigación Geana de la Universidad del Valle, por la colaboración en los bioensayos con hormiga arriera especialmente a Jonathan Rodríguez y al Dr. James Montoya.

A Luis Eduardo Hurtado y Carlos Rodríguez por la toma de Espectros.

A mis amigos del Grupo de Investigación de Compuestos Heterocíclicos por los momentos compartidos.

A Paola Acosta, Bibiana Cano, Danny Balanta, Daniel Insuasty por su valiosa amistad, además por vivir conmigo este proceso de ser estudiante de posgrado.

A la familia Martínez Cano especialmente a Vanessa Ibarra por involucrarme como parte de su familia y por sus llamados de atención.

A las familias Pantoja, Pérez Viveros, Ramírez Ricaurte y Pulido Arevalo por creer en mí.

A Juan Carlos Rodríguez por su amor y por verme como su compañera de vida.

A mis padres por su amor irracional, incondicional y genuino.

A Dios porque a Él se lo debo todo ***“LA FE DEBE SER INQUEBRANTABLE”***

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
CAPITULO 1. ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE HOJAS DE <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	19
1.1 INTRODUCCIÓN	19
1.1.1 Actividad insecticida y de inhibición de colinesterasa de extractos de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	19
1.1.2 Actividad antioxidante de extractos de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	21
1.2 ANTEDECENTES GENERALES	24
1.2.1 Aspectos botánicos de la especie <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	24
1.2.2 Metabolitos secundarios a partir de la especie <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	24
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
1.3.1 Actividad insecticida y de inhibición de colinesterasa en extractos de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	28
1.3.2 Aislamiento, identificación, elucidación estructural y actividad antioxidante de compuestos fenólicos en extractos de hojas de <i>Tithonia diversifolia</i>	37
1.4 SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	61
1.4.1 Instrumentación general.....	61
1.4.2 Material vegetal	62
1.4.3 Obtención de extractos de hojas de <i>Tithonia diversifolia</i>	62
1.4.4 Evaluación de la actividad insecticida de extractos de hojas de <i>Tithonia diversifolia</i> sobre hormigas cortadoras de hojas de <i>Atta cephalotes</i>	62
1.4.5 Aislamiento de derivados de ácidos cafeico a partir de extractos polares de hojas de <i>Tithonia diversifolia</i> con actividad antioxidante.....	65
CAPITULO 2. SÍNTESIS TOTAL Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE REGIOISOMEROS ANÁLOGOS DE ACHYROFURANO	70
2.1 INTRODUCCIÓN	70
2.2 ANTECEDENTES GENERALES	73
2.2.1 Generalidades de <i>Achyrocline satuireioides</i>	73

2.2.2 Generalidades de derivados de floroglucinol.....	76
2.2.3 Generalidades de los dibenzofuranos.....	78
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
2.3.1 Análisis retrosintético para la obtención de análogos estructurales de achyrofurano	86
2.3.2 Preparación de derivados de floroglucinol	88
2.3.3 Síntesis de derivados de acilfloroglucinol mediante acoplamiento de Suzuki- Miyaura.....	94
2.3.4 Síntesis de acilfloroglucinoles mediante desprotección de grupos ésteres de bencilo.....	97
2.3.5 Síntesis de dibenzofuranos acil polioxigenados mediante la ciclación oxidativa de fenoles sustituidos	100
2.3.6 Actividad antibacteriana de acilfloroglucinoles y análogos de achyrofurano ...	105
2.4 SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	108
2.4.1 Instrumentación general y reactivos	108
2.4.2 Síntesis de derivados de floroglucinol	109
2.4.3 Síntesis de dibenzofuranos acil polioxigenados	114
2.4.4 Caracterización de compuestos obtenidos (Anexos)	115
2.4.5 Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados acilfloroglucinoles y dibenzofuranos.....	115
CONCLUSIONES	117
REFERENCIAS.....	120
ANEXOS	131

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AcOH	Ácido acético
AG	Ácido gálico
AMP	Adenosín monofosfato
<i>ax</i>	Axial
br dd	Doble doblete ancho
br s	Singulete ancho
BuChE	Butirilcolinesterasa
BW284C51	Bromuro de 1,5-bis(4-dialildimetilamonio fenil)pentan-3-ona
CAN	Ceric ammonium nitrate
CC	Cromatografía de columna
CCD	Cromatografía de capa delgada
CCR	Capacidad captora de radicales
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CMC	Carboximetilcelulosa
COSY	Correlation spectroscopy
CQA	Ácidos cafeoilquínicos
CTF	Contenido total de fenoles
DAD	Diode array detector
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
diCQA	Ácidos dicafeoliquínicos
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Eq	Equivalente
<i>eq</i>	Ecuatorial
ES	Extracto seco
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
FBPasa	Fructosa bifosfatasa
FDA	Food and drug administration
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FRS ₅₀	Free radical scavenging
GP	Grupo protector
h	Horas

HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HPLC-DAD	High performance liquid chromatography with a diode-array detector
HPTLC	High-performance thin-layer chromatography
HR-MS	High resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IPA	Isopropanol
Iso-OMPA	Tetraisopropil pirofosforamida
IR	Infrarrojo
<i>J</i> -res	Homonuclear <i>J</i> -resolved spectroscopy
m	Multiplete
MCB	Minimum bacterial concentration
MIC	Minimum inhibitory concentration
min	Minutos
MM2	Mecánica molecular (Energy Minimization with hindered rotation)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
MW	Radiación microondas
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NIS	<i>N</i> -yodosuccinimida
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
OMS	Organización mundial de la salud
P. f.	Punto de fusión
PIFA	[Bis(trifluoroacetoxi)iodo]benceno
PN	Producto natural
ppm	Partes por millón
Rend.	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	Singulete
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
Td	<i>Tithonia diversifolia</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TLC	Thin-layer chromatography
TNF-α	Tumor necrosis factor

TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
UV-Vis	Ultravioleta visible
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> intermedio resistente a la vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray ⁵¹	24
Figura 2. Sesquiterpenlactonas aisladas en <i>Tithonia diversifolia</i>	25
Figura 3. Flavonoides, esteroides y ácidos carboxílicos aislados de <i>Tithonia diversifolia</i>	26
Figura 4. Compuestos fenólicos aislados de las partes aéreas de <i>Tithonia diversifolia</i>	27
Figura 5. Toxicidad de DMSO y CMC en el tiempo. A) Experimento de ingestión. B) Experimento de contacto.....	29
Figura 6. Efectividad de extractos en diferentes solventes de <i>T. diversifolia</i> mediante ingestión.....	30
Figura 7. Efectividad del extracto de diclorometano de <i>T. diversifolia</i> a diferentes concentraciones mediante ingestión.	33
Figura 8. Efectividad de los extractos en diferentes solventes de <i>T. diversifolia</i> mediante contacto.....	34
Figura 9. CCR-DPPH dependiente de la concentración de extractos de <i>T. diversifolia</i>	38
Figura 10. Comparación entre los FRS ₅₀ y CTF de los extractos de <i>T. diversifolia</i>	39
Figura 11. Aislamiento de compuestos guiado por capacidad antioxidante.....	40
Figura 12. Comparación entre los FRS ₅₀ y CTF de fracciones a partir de Td 2.3.....	40
Figura 13. Cromatograma del extracto Td 2.3 de <i>T. diversifolia</i>	41
Figura 14. Comparación entre los FRS ₅₀ y CTF de fracciones a partir de Td 2.3.3.....	42
Figura 15. Comparación entre los FRS ₅₀ y CTF de fracciones a partir de Td 2.3.1.....	42
Figura 16. Estructuras propuestas para los derivados de ácidos cafeico aislados a partir del extracto butanólico de <i>T. diversifolia</i>	43
Figura 17. Apertura del anillo oxirano de 1 produciendo los diastereómeros <i>eritro</i> y <i>treo</i> 8	44
Figura 18. Espectros de HR-ESI-MS en modos positivo y negativo del compuesto 1	45
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 1 , tomado en CD ₃ OD.	46
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C y DEPT-135 del compuesto 1 , tomado en CD ₃ OD.....	47
Figura 21. Correlaciones HMBC más importantes para el compuesto 1	48
Figura 22. Correlaciones NOESY (A) y COSY (B) más importantes para el compuesto 1	49
Figura 23. Espectros de HR-ESI-MS en modo negativo del compuesto 2	51
Figura 24. Espectros de HR-ESI-MS en modo negativo del compuesto 3	52
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 2 , tomado en CD ₃ OD.	53
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3 , tomado en CD ₃ OD.	54
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 2 , tomado en CD ₃ OD.....	55
Figura 28. Comparación de espectros de RMN ¹ H de los compuestos 5 , 6 y 7 , tomados en CD ₃ OD.....	57
Figura 29. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de los compuestos 5 , 6 y 7 de <i>T. diversifolia</i>	58
Figura 30. Dibenzofuranos polioxigenados con actividad antibacteriana.	72
Figura 31. Estructura química de (A) quercetina, (B) luteolina, (C) 3- <i>O</i> -metilquercetina y (D) achyrobichalcona encontrados en <i>A. satureioides</i>	74
Figura 32. Estructura química de floroglucinoles prenilados α -pironas 13-16 y dibenzofurano 17 aislados de <i>A. satureioides</i>	76
Figura 33. Acilfloroglucinoles con actividad antibacteriana.	77

Figura 34. Estructuras químicas de dibenzofuranos con actividad anti-cáncer.....	79
Figura 35. Estructura química de dibenzofuranos vialinins (B y C), y ganbajunin B.....	80
Figura 36. Estructura química de dibenzofuranos antibacterianos; ácido úsnico y Boleptosins.....	81
Figura 37. Dibenzofuranos aislados de <i>Pilidiostigma glabrum</i>	82
Figura 38. Síntesis total de rhodomyrtoxin C.....	83
Figura 39. Síntesis total de análogos de achyrofurano 30 y 31	84
Figura 40. Síntesis total de preachyrofurano 32	85
Figura 41. Espectro de RMN ^1H del compuesto 36 , tomado en CDCl_3	93
Figura 42. Espectros de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto 36 , tomado en CDCl_3	93
Figura 43. Espectro de RMN ^1H del compuesto 37b , tomado en CDCl_3	97
Figura 44. Espectro de RMN ^1H del compuesto 38b , tomado en $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	99
Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 38b , tomado en $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$	99
Figura 46. Espectro de RMN ^1H del compuesto 39b , tomado en CDCl_3	101
Figura 47. Correlaciones claves en HMBC para el dibenzofurano 39b	102
Figura 48. Correlaciones HMBC más importantes para el compuesto 39b en CDCl_3	103
Figura 49. Correlaciones HMBC más importantes para el compuesto 39b en CD_3OD	104
Figura 50. Conformación de energía mínima para el bifenilo 48	104

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Actividad insecticida de extractos de <i>T. diversifolia</i> aplicados mediante ingestión.	33
Tabla 2. Actividades inhibitorias de colinesterasas (AChE y BuChE) de extractos y fracciones de <i>T. diversifolia</i> .	35
Tabla 3. Datos de RMN ^1H (J en Hz) y RMN ^{13}C de los compuestos 1 y 8 en CD_3OD (δ ppm, TMS como estándar interno).	50
Tabla 4. Datos de RMN ^1H (J en Hz) y RMN ^{13}C de compuestos aislados a partir de hojas de <i>T. diversifolia</i> (400 MHz, δ ppm, en CD_3OD).	55
Tabla 5. Actividad antioxidante ^{a)} de fracciones y compuestos a partir de hojas de <i>Tithonia diversifolia</i> .	59
Tabla 6. Actividad antibacteriana de dibenzofuranos naturales contra diferentes cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	72
Tabla 7. Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis del derivado de acilfloroglucinol 37a .	95
Tabla 8. Condiciones óptimas de reacción encontradas para la síntesis de derivados de acilfloroglucinol 37a-g con irradiación de MW.	96
Tabla 9. Resultados de actividad antibacteriana y actividad citotóxica (MIC en μM o $\mu\text{g/mL}$) de acilfloroglucinoles y regioisómeros análogos de achyrofurano.	106

LISTADO DE ESQUEMAS

Esquema 1. Etapas para la síntesis de acilfloroglucinoles.....	78
Esquema 2. Sitios de diversidad estructural en análogos de achyrofurano.	87
Esquema 3. Estrategia sintética para la obtención de análogos de achyrofurano.....	87
Esquema 4. Metodologías ensayadas para la síntesis de 1,3,5-tris(benciloxi)benceno.....	89
Esquema 5. Metodologías empleadas para la síntesis del compuesto acilado 40	90
Esquema 6. Condiciones óptimas de reacción para la síntesis del compuesto acilado 40	90
Esquema 7. Metodologías empleadas para la síntesis del compuesto yodado 36	92
Esquema 8. Condiciones óptimas de reacción para la síntesis del compuesto 36	92
Esquema 9. Especies activas para la yodación.	92
Esquema 10. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura para la síntesis de derivados de acilfloroglucinol 37 con irradiación de MW.....	96
Esquema 11. Condiciones óptimas de reacción para la síntesis de acilfloroglucinoles.	98
Esquema 12. Dimerización oxidativa biomimética para la síntesis de análogos de achyrofurano 39a-b	100

RESUMEN

En la presente tesis se describe la actividad biológica de derivados de ácido cinámico en *Tithonia diversifolia* y regioisómeros análogos de achyrofurano en *Achyrocline satureoides*. Con el fin de proporcionar un orden secuencial del trabajo de investigación, el documento se estructuró en dos capítulos. En la primera parte del capítulo 1, se describe la evaluación de diferentes extractos de hojas secas de *T. diversifolia* sobre obreras de colonias de laboratorio de *Atta cephalotes* mediante ingestión y contacto. Adicionalmente, se analizó la actividad biológica de los extractos como inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE). El extracto de diclorometano a 1000 ppm, mediante ingestión, presentó la mayor actividad insecticida, al causar 70 y 90% de mortalidad de hormigas obreras en solo cinco y siete días de tratamiento, respectivamente. Los valores de inhibición de la acetilcolinesterasa, mostraron que el extracto de diclorometano tuvo mejor IC₅₀, en comparación a sus fracciones lo que demuestra que la actividad se potencializa al usar el extracto crudo. Estos resultados pueden asociarse a la existencia de terpenos y sesquiterpenlactonas presentes en *T. diversifolia* probablemente inhibidores de la AChE. En la segunda parte, se reporta el aislamiento de un nuevo derivado de ácido cafeico a partir del extracto butanólico de hojas de *Tithonia diversifolia*. La estructura se determinó como ácido (*E*)-3-(((3-(3,4-dihidroxifenil)acrililoilo)metil)-2-metiloxirano-2-carboxílico (**1**). Además, se aislaron seis conocidos ácidos fenólicos, ácido 4,5-di-*O*-dicafeoilquinico (**2**), ácido 3,4-di-*O*-dicafeoilquinico (**3**), ácido 3,5-di-*O*-dicafeoilquinico (**4**), ácido 3-*O*-cafeoilquinico (**5**), ácido 4-*O*-cafeoilquinico (**6**) y ácido 5-*O*-cafeoilquinico (**7**); los compuestos **1**, **2** y **3** son reportados por primera vez en esta especie. Las estructuras de los compuestos se establecieron basándose en LC-MS y análisis espectroscópicos de RMN (1D) y (2D). La evaluación de la capacidad antioxidante, realizada en placas de 96 pozos, mostró que los derivados de ácido cafeico probados poseen fuerte capacidad captora de radicales DPPH y moderado poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).

Finalmente, en el capítulo 2 se describe la obtención de dos dibenzofuranos polioxigenados simétricos análogos de achyrofurano (**39a-b**) con restos 2-metilbutiroilo en C-4 y C-6 a partir de floroglucinol comercial, a través de una secuencia de reacciones que incluyen monoacilación, yodación, acoplamiento Suzuki-Miyaura, dimerización oxidativa y ciclación.

Adicionalmente con esta ruta, se sintetizaron nuevos compuestos racémicos: un derivado de floroglucinol yodado (**36**), siete derivados de acilfloroglucinol (**37a-g**) y tres acilfloroglucinoles (**38a-b**, **46**). Algunos de los compuestos obtenidos fueron activos contra bacterias Gram-positivas, incluyendo aislados clínicos multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. El dibenzofurano **39b** con cadenas de propilo en C-2 y C-8 exhibió la mejor actividad antibacteriana con valores comparables a los del dibenzofurano achyrofurano natural.

Palabras claves: Botón de oro; Hormigas cortadoras de hojas; Actividad insecticida; Actividad inhibitoria de colinesterasa; Derivados de ácido cafeico; 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; Actividad captora de radicales libres; Poder antioxidante reductor de hierro; Contenido total de fenoles; Actividad antibacteriana; Dibenzofuranos; Derivados de floroglucinol.

ABSTRACT

This thesis describes the biological activity of cinnamic acid derivatives in *Tithonia diversifolia* and analog regioisomers of achyrofuran in *Achyrocline satureoides*. In order to provide a sequential order of research work, this thesis was structured in two chapters. In the first part of Chapter 1, the evaluation of different extracts of *T. diversifolia* dry leaves on worker ants from laboratory colonies of *Atta cephalotes* through ingestion and contact is described. In addition, the biological activity of the extracts as inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) was evaluated. The dichloromethane extract at 1000 ppm presented the highest insecticidal activity through ingestion, causing 70 and 90% worker ant mortality after 5 and 7 days of treatment, respectively. The acetylcholinesterase inhibition values showed that the dichloromethane presented the best IC₅₀, compared to its fractions, which demonstrates that its activity is potentiated when the crude extract is used. Our results can be attributed to the existence of terpenes and sesquiterpene lactones, which are likely inhibitors of AChE, in *T. diversifolia*. In the second part, the isolation of a new caffeic acid derivative from the leaves of *Tithonia diversifolia* is reported. The structure was determined as (*E*)-3-(((3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyl)oxy)methyl)-2-methyloxirane-2-carboxylic acid (**1**). Additionally, six known phenolic acids, 3,4-di-*O*-dicyclohexylic acid (**3**), 3,5-di-*O*-dicetheoylquinic acid (**4**), 3-*O*-caffeoylquinic acid (**5**), 4-*O*-caffeoylquinic acid (**6**) and 5-*O*-caffeoylquinic acid (**7**), were also isolated; **1**, **2** and **3** are the first reports for this species. The structures of compounds **1**, **2** and **3** were established based on LC-MS and one- and two-dimensional (1D)- and (2D)-NMR spectroscopic analyses. Antioxidant activity evaluation in 96-well plate format, showed caffeic acid derivatives as strong 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavengers and moderate ferric reducing antioxidant power (FRAP).

Finally, chapter 2 describes the production of two symmetrical polyoxygenated dibenzofurans analogous to achyrofuran (**39a-b**) with 2-methylbutyl moieties at C-4 and C-6 from commercial phloroglucinol, through a sequence of reactions that include monoacylation, iodination, Suzuki-Miyaura coupling, oxidative dimerization and cyclization. In addition to this route, novel racemic compounds were synthesized: an

iodinated floroglucinol derivative (**36**), seven acylphloroglucinol derivatives (**37a-g**) and three acylphloroglucinols (**38a-b**, **46**). Some of the compounds obtained were active against Gram-positive bacteria, including multiresistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. The dibenzofuran **39b** with propyl chains at C-2 and C-8 exhibited the best antibacterial activity with values comparable to those of the natural dibenzofuran achyrofuran.

Keywords: Tree marigold; Leafcutter ants; Insecticidal activity; Inhibitory activity of cholinesterase; Caffeic acid derivatives; Free radical-scavenging activity; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; Ferric reducing antioxidant power; Total phenolic content; Antibacterial activity; Dibenzofurans; Phloroglucinol derivatives.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Históricamente, los productos naturales (PN) han jugado un papel importante en la identificación y desarrollo de fármacos¹. Tal es el caso del taxol, aislado de la especie *Taxus brevifolia* con acción antitumoral; la galantamina, aislado de las flores de *Galantus caucasicus*, útil en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer; eritromicina hallado de las cepas de *Streptomyces eriterus*. Haciendo uso de la síntesis orgánica se han obtenido derivados que en algunos casos han presentado mejores actividades que sus precursores. Ejemplo, el docetaxel derivado del taxol, azitromicina derivado de la eritromicina. Newman y Cragg, encontraron que más del 60% de todos los fármacos aprobados por la FDA entre 1981 y 2014 se asemejan a PN, de los cuales el 6% son inalterados, el 26% son derivados de PN y el 32% imitan y/o contienen un farmacóforo de un PN, adicionalmente, el 35% corresponden a fármacos elaborados por química sintética²⁻³. Cabe resaltar, que los avances en investigaciones biomédicas no hubieran sido posible sin la química de PN y la síntesis orgánica. Por lo tanto, los PN son la base para el diseño y síntesis de análogos de compuestos potencialmente activos, haciéndolos atractivos en la búsqueda permanente de nuevos metabolitos secundarios, y la síntesis orgánica abarca la búsqueda de nuevas y eficientes metodologías para la obtención de compuestos bioactivos.

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas, con más de 8.000 estructuras fenólicas actualmente conocidas. Estos se clasifican en fenoles simples (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, derivados de floroglucinol o de ácido benzoico) y complejos (flavonoides, lignanos, taninos). Numerosos reportes han mostrado el amplio espectro de actividades biológicas que presentan los compuestos fenólicos, entre las cuales se destacan actividad ansiolítica, antidepresiva, inhibidores de monoamino oxidasas, sedante, antiinflamatoria, antibacteriana, antitumoral, insecticida, antifúngica y antioxidante⁴⁻⁶. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos ha llamado la atención de investigadores y nutricionistas en los últimos años, porque han mostrado su habilidad para prevenir la descomposición oxidativa de ácidos grasos, como también, ser una defensa contra el estrés oxidativo de las células, producido por agentes oxidantes y radicales libres⁷. Los efectos que han tenido sobre diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, promueven el consumo de alimentos

que contengan gran cantidad de estos compuestos⁸, como también el descubrimiento de esta clase de compuestos en plantas.

La actividad antioxidante está relacionada con la actividad antifúngica por medio del estrés oxidativo necesario para la reproducción de los hongos, y en algunos casos, la actividad antifúngica puede estar relacionada con la actividad insecticida, como en relaciones mutualistas entre insectos y hongos. Por ejemplo, las hormigas cortadoras de hojas de *Atta cephalotes* viven con el hongo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Estos insectos causan pérdidas económicas relacionadas con la defoliación parcial o total de cultivos, plantas ornamentales, pastizales, árboles de importancia forestal, entre otros. Las hormigas arrieras tienen preferencia por ciertas especies de plantas, a las cuales defolian repetidamente, siendo *Tithonia diversifolia* evitada como sustrato. Cuando las colonias son obligadas a alimentarse con esta planta, alcanzan a reducir hasta un 83.3% el tamaño del hongo⁹, además el extracto etanólico de hojas secas de *T. diversifolia* produce el 100% de mortalidad de hormigas obreras en solo ocho días¹⁰. Por lo anterior, se formuló la siguiente pregunta encaminada a aportar hacia la agricultura: ¿Los extractos y/o metabolitos secundarios de hojas de *Tithonia diversifolia* presentan actividad insecticida contra *Atta cephalotes*, y además actividad antioxidante?.

Por otro lado, la resistencia bacteriana es un fenómeno que aparece de forma natural por modificaciones genéticas; sin embargo, se ve facilitada por el uso incontrolado e inadecuado de los antibióticos¹¹. Según la organización mundial de la salud (OMS) la resistencia bacteriana es una de las mayores amenazas en el mundo, infecciones comunes como neumonía, tuberculosis y gonorrea producidas por bacterias Gram-positivas podrían convertirse en infecciones difíciles de tratar en un futuro¹². Un patógeno humano con gran capacidad de adquirir resistencia bacteriana son los *Staphylococcus aureus*. Diferentes compuestos se han usado contra estas bacterias, ejemplo la penicilina, metilicina y vancomicina, sin embargo, ya se han reportado cepas resistentes a estos compuestos. Otros betalactámicos y glicopéptidos han demostrado ser cada vez menos eficaces en la eliminación de las cepas más virulentas de *S. aureus*. El metabolito secundario achyrofurano aislado de hojas de *Achyrocline satureoides*, que contiene en su estructura dos unidades de floroglucinol

dimerizadas en un dibenzofurano prenilado, ha mostrado una marcada actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-positivas, específicamente contra cepas resistentes de *S. aureus*. Otros dibenzofuranos aislados de otras plantas han presentado actividad antibacteriana, siendo el achyrofurano el compuesto con los valores más bajos de concentración inhibitoria mínima (MIC) contra diferentes cepas de *S. aureus*¹³⁻¹⁴. En este sentido, se formularon las siguientes preguntas encaminadas a contribuir en la farmacia específicamente en el problema de la resistencia bacteriana: ¿análogos sintéticos de achyrofurano presentarán mayor actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas? y ¿cuáles son los requisitos estructurales para potencializar la actividad antibacteriana?. Hasta la fecha, se han reportado varias aproximaciones sintéticas para la obtención de análogos del PN. Sin embargo, solo una aproximación, implicó la obtención de un compuesto de estructura muy similar al achyrofurano, en cinco pasos de reacción y con un rendimiento global de 5%¹⁵; involucrando diazoalcanos inestables y bajos rendimientos en las etapas de desmetilación. Por lo tanto, en esta investigación se tuvieron en cuenta estas limitantes y se plantea una ruta alterna para las síntesis de análogos estructurales de achyrofurano.

OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir en el conocimiento químico en extractos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray y en análogos sintéticos de achyrofurano de *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC., con posibles actividades insecticida, antioxidante y antibacteriana.

Objetivos específicos

Para dar cumplimiento con el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

Área de química de productos naturales:

- ✓ Obtener extractos de las hojas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, de diferente polaridad.
- ✓ Evaluar la actividad insecticida y antioxidante de diferentes extractos y compuestos aislados de hojas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.
- ✓ Aislar metabolitos secundarios presentes en extractos activos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray por técnicas de separación cromatográficas.
- ✓ Elucidar las estructuras de metabolitos secundarios aislados, por espectroscopía de IR, RMN uni- y bidimensional y espectrometría de masas.

Área de síntesis total de productos naturales:

- ✓ Sintetizar nuevos derivados de acilfloroglucinol mediante reacciones de acoplamiento de Suzuki-Miyaura partiendo del compuesto 1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-iodofenil]-2-metilbutan-1-ona.
- ✓ Realizar la síntesis de nuevos análogos de achyrofurano mediante reacciones de dimerización y ciclación oxidativa de fenoles.
- ✓ Establecer las condiciones óptimas para la síntesis de nuevos compuestos en la ruta de obtención de análogos de achyrofurano.
- ✓ Elucidar las estructuras de los productos obtenidos por espectroscopía de IR, RMN uni- y bidimensional y espectrometría de masas y difracción de rayos-X, en caso de obtener monocristales.
- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana de los análogos obtenidos.

CAPITULO 1. ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE HOJAS DE *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Actividad insecticida y de inhibición de colinesterasa de extractos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

A través de procesos co-evolutivos, la mayoría de las plantas han desarrollado mecanismos de defensa contra herbívoros. De esta manera, las plantas producen sustancias tales como flavonoides, esteroides, cumarinas, alcaloides, terpenos y sesquiterpenlactonas que se denominan metabolitos secundarios¹⁶. Estas sustancias, aunque no tienen un rol directo en el crecimiento o la reproducción de las plantas, les ayudan a sobrevivir, al permitirles interactuar con su medio ambiente, defendiéndose contra insectos herbívoros, patógenos, parásitos, etc¹⁷⁻¹⁸. La biosíntesis de los metabolitos secundarios está regulada por genes cuya expresión y actividad están directamente influenciada por factores ambientales. Sin embargo, existen insectos que pueden evitar diversos mecanismos de defensa de las plantas con una gran aptitud fisiológica y conductual, ejemplo de ello son, las hormigas cortadoras de hojas (Formicidae: Myrmicinae: Attini), las cuales representan plagas agrícolas graves¹⁹. De hecho, ningún agente de control probado hasta el momento, ha sido totalmente efectivo para superar las defensas biológicas y de comportamiento contra estas hormigas, bajo condiciones naturales. Aunque algunos insecticidas sintéticos como organofosforados, piretroides sulfamidados, se emplean en el control y regulación de sus poblaciones²⁰ mediante la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE)²¹, su eficiencia es cuestionable y son objeto de prohibición en varios países debido a su alta estabilidad y toxicidad química que afectan y ponen en riesgo a otros seres vivos y contaminan el medio ambiente²⁰. Por esta razón, el desarrollo de alternativas ecológicas, que los sustituyan es altamente deseable.

Por otro lado, la acetilcolina (ACh) es uno de los principales neurotransmisores que tienen los insectos. Esta participa en la transmisión de impulsos eléctricos entre células nerviosas mediante un proceso conocido como sinapsis. Los neurotransmisores son almacenados en estructuras llamadas vesículas, las cuales liberan su contenido gracias a una despolarización

de la membrana. La inactivación de la ACh se realiza mediante degradación enzimática por la AChE, la cual hidroliza el enlace éster en la molécula, conduciendo a la pérdida de la actividad estimuladora²²⁻²³. La inhibición de la AChE causa acumulación de ACh en la hendidura sináptica, de modo que la membrana postsináptica estará en estado de estimulación permanente²⁴, por lo cual, la AChE ha sido intensamente usada como indicador en la búsqueda de insecticidas²⁵.

En el desarrollo de métodos de control para las hormigas cortadoras de hojas, es necesario tener en cuenta la estrecha y ancestral relación mutualista que estas tienen con el hongo *Leucoagaricus gongylophorus*¹⁹. De hecho, se considera que la preferencia por plantas puede estar relacionada con las demandas nutricionales para la sobrevivencia de este hongo²⁶. Giraldo²⁷ encontró que árboles de *Montanoa quadrangularis* plantados y fertilizados con *T. diversifolia*, eran menos atacados por *Atta cephalotes* L., una de las plagas agrícolas presentes en América Latina. Rodríguez G. y col.²⁸ encontraron que, bajo condiciones de laboratorio, *A. cephalotes* forrajea, de forma oportunista, las hojas de *T. diversifolia* cuando la disponibilidad de otro recurso vegetal es mínima. Cuando las colonias son obligadas a alimentarse con esta planta, alcanzan a reducir hasta un 100% el tamaño del hongo (calculado por volumen en cm³)⁹, además se encontró, que el extracto etanólico (1.2 g de hojas seca por litro de etanol) de *T. diversifolia* produce el 83.3% de mortalidad de hormigas obreras en solo ocho semanas¹⁰. Recientemente, en un estudio realizado en condiciones naturales, Rodríguez y col.²⁹ encontraron que el abono verde de *T. diversifolia*, ocasiona el desplazamiento de las cámaras de cultivo del hongo a zonas más profundas, y la construcción de nuevas cámaras fuera del área de degradación del abono. Tanto por sus propiedades antifúngicas como insecticidas, *T. diversifolia* encierra un gran potencial para el control de la hormiga arriera como de otras plagas agrícolas.

1.1.2 Actividad antioxidante de extractos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

Como se mencionó anteriormente, los metabolitos secundarios son cruciales para muchos aspectos funcionales importantes de la vida vegetal, además de estar implicados en estrategias de defensa, estos hacen parte de la estructura de algunos tejidos de apoyo y protección, y también, confieren propiedades de señalización particularmente en las interacciones entre plantas y su entorno⁴.

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas, con más de 8.000 estructuras fenólicas actualmente conocidas, los cuales están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por patógenos, parásitos y depredadores, además contribuyen en los colores de hojas y flores³⁰. Estos compuestos, son parte integral de la dieta humana al estar presentes en frutas, verduras, cereales, aceitunas, legumbres, chocolate, etc., como también en bebidas (té, café, cerveza, vino, etc.). Adicionalmente, los compuestos fenólicos sintetizados por las plantas superiores, representan un claro ejemplo de plasticidad metabólica, la cual permite a las plantas adaptarse a ambientes bióticos y abióticos cambiantes y proporcionar características como el color, el sabor y otros beneficios aprovechados en muchas áreas especialmente para la salud. La distribución de muchas estructuras fenólicas está restringido a géneros o familias específicas, convirtiéndolas en algunos casos en biomarcadores usados en estudios taxonómicos⁴.

Muchos mecanismos celulares mantienen bajo control estricto los procesos de oxidación que regulan la energía en todos los organismos vivos³¹. Sin embargo, el desequilibrio en los mecanismos de protección antioxidante y un exceso en la generación de radicales libres pueden desencadenar numerosas enfermedades, tales como cardiovasculares y neurodegenerativas⁸ y acelerar el envejecimiento; cuando los mecanismos enzimáticos fallan o son ineficientes, los antioxidantes de pequeño peso molecular se consideran como agentes de protección que disminuyen el daño oxidativo en el cuerpo humano³².

Hoy en día, existe un gran interés en sustancias naturales que exhiben propiedades antioxidantes, las cuales son suministradas a humanos y animales en productos alimenticios

o farmacéuticos con acciones preventivas y específicas. Muchas infusiones de hierbas, frecuentemente usadas como medicinas caseras, tienen propiedades antioxidantes y farmacológicas relacionadas con la presencia de metabolitos secundarios de tipo fenólico, especialmente ácidos fenólicos y flavonoides³³. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos ha llamado la atención de investigadores, nutricionistas y fabricantes de alimentos, además, los efectos que han tenido sobre diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, como cáncer y otras enfermedades, confirmadas por medio de distintos estudios *in vivo* e *in vitro*, promueven el consumo de alimentos que contengan gran cantidad de estos compuestos⁸. Otros estudios sugieren que los fenoles pueden prevenir la obesidad y reducir el riesgo de diabetes, enfermedad coronaria, cáncer de colon y trastornos gastrointestinales³⁴⁻³⁶. Además, los compuestos fenólicos han mostrado su habilidad para prevenir la descomposición oxidativa de ácidos grasos, como también, ser una defensa contra el estrés oxidativo de las células, producido por agentes oxidantes y radicales libres⁷. Las diferentes propiedades biológicas de los compuestos fenólicos y sus beneficios para la salud han impulsado las investigaciones por descubrir e identificar esta clase de compuestos en extractos polares y apolares de diferentes plantas, aportando en áreas como química médica y farmacológica.

Muchas de las investigaciones etnomedicinales realizadas a *T. diversifolia*, han mostrado los constituyentes químicos en extractos apolares y medianamente polares, especialmente sesquiterpenlactonas, diterpenos, flavonoides, derivados de ácido clorogénico³⁷⁻⁴⁰. Así mismo, estudios biológicos realizados a diferentes extractos y compuestos han revelado distintas actividades biológicas, como antidiabética y anti-malaria, entre otras^{17, 41-46}; extractos acuosos, etanólicos y metanólicos obtenidos de las hojas de esta planta, han revelado actividad captora de radicales DPPH y ABTS como también, actividad de captora de aniones superóxido⁴⁷⁻⁴⁹; sin embargo, son pocos los reportes de compuestos fenólicos aislados e identificados en extractos polares de *T. diversifolia* que presentan actividad antioxidante; estos hechos impulsan a buscar metabolitos secundarios simples con actividad antioxidante que contribuyan al conocimiento fitoquímico de *Tithonia diversifolia*, e indirectamente aporte en plantas utilizadas como alimento para ganado y en el control de plagas.

1.2 ANTEDECENTES GENERALES

1.2.1 Aspectos botánicos de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae: Heliantheae) es un arbusto perenne, nativo de México y Centroamérica, pero actualmente distribuida en todo el mundo ⁵⁰. Esta planta conocida como botón de oro tiene un amplio rango de adaptación, crecimiento rápido y vigoroso, buena capacidad de producción de biomasa y es aprovechada como abono y para alimentación animal⁵¹. Botón de oro puede formar grandes colonizaciones, por ello es considerada en algunos países como planta invasora¹⁷.

Algunas de sus características son: herbácea o arbustiva robusta de 1.5 a 4.0 m de altura, sus hojas son alternas, pecioladas, de 7 a 20 cm de largo y 4 a 20 cm de ancho, divididas en 3 a 5 lóbulos, bordes aserrados, presenta vistosas flores que surgen en cabezuelas grandes, agrupadas, o bien solitarias que se sostienen sobre pedúnculos fuertes (de hasta 20 cm de largo), lígulas amarillas a naranja de 3 a 6 cm de longitud y corolas amarillas de 8 mm de longitud (Fig. 1). El fruto es seco y contiene una sola semilla, es oblongo, de hasta 6 mm de largo⁵².



Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Eudicotyledoneae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	Tithonia
Especie:	<i>T. diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray

Figura 1. Taxonomía de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray⁵².

1.2.2 Metabolitos secundarios a partir de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

Se han reportado más de 150 compuestos de *T. diversifolia*, y es considerada la especie más estudiada del género *Tithonia*¹⁷. Entre los metabolitos secundarios aislados están los

sesquiterpenos, especialmente sesquiterpenlactonas (Fig. 2)⁵³⁻⁵⁵, que son, de hecho, marcadores quimiotaxonómicos para las tribus de la familia Asteraceae⁵⁶. Además, están presentes otros constituyentes químicos tales como esteroides, flavonoides, cumarinas, ácidos carboxílicos (Fig. 3), otros fenoles y derivados de ácido clorogénico³⁹ (Fig. 4). Algunos de ellos son responsables de los efectos biológicos de esta especie, como las actividades antiinflamatoria, analgésica, antiviral, antipalúdica, antibacteriana, antioxidante, antihipoglucemiante, antimicótica, insecticida y repelente^{17, 41-43, 57}.

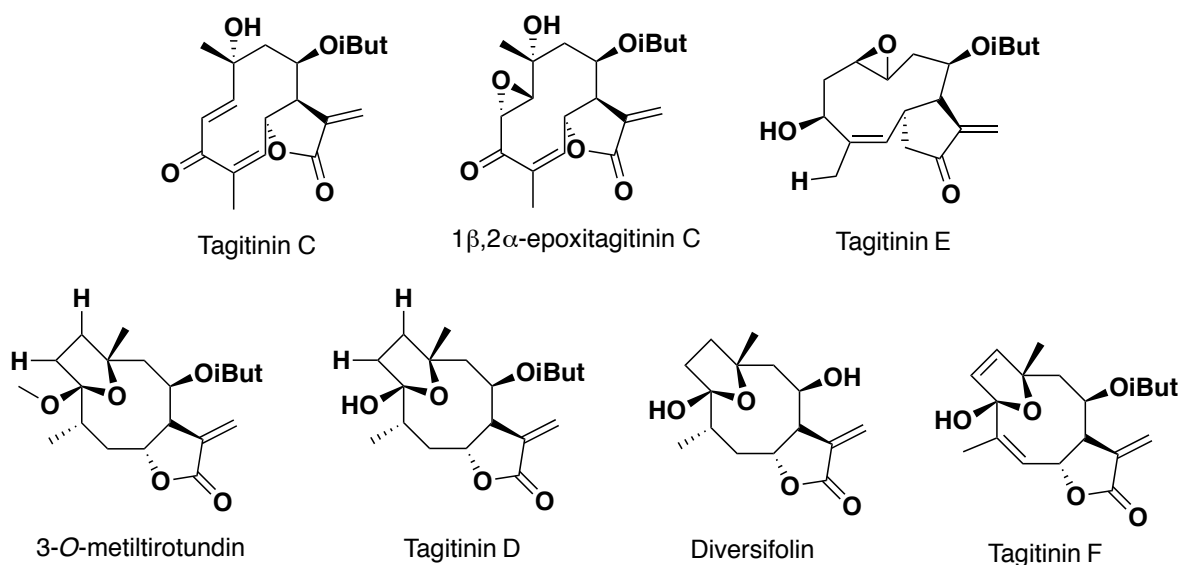


Figura 2. Sesquiterpenlactonas aisladas en *Tithonia diversifolia*.

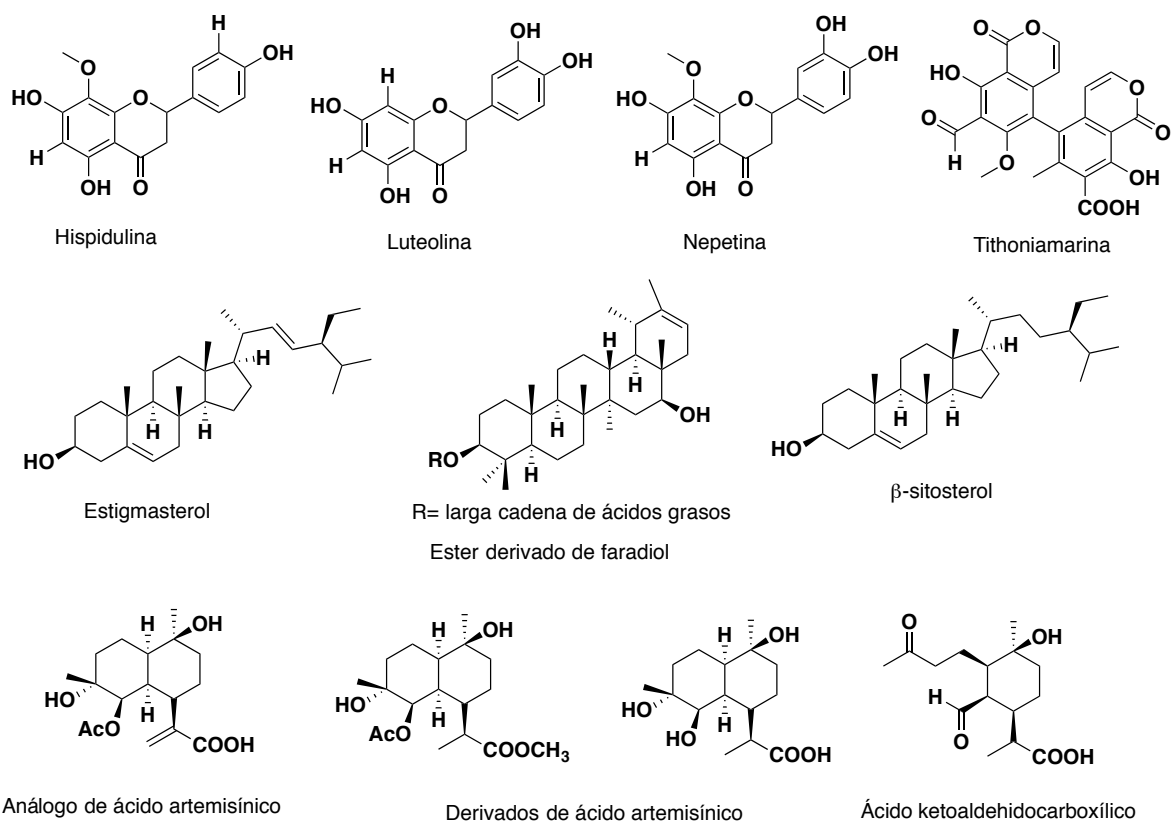


Figura 3. Flavonoides, esteroides y ácidos carboxílicos aislados de *Tithonia diversifolia*.

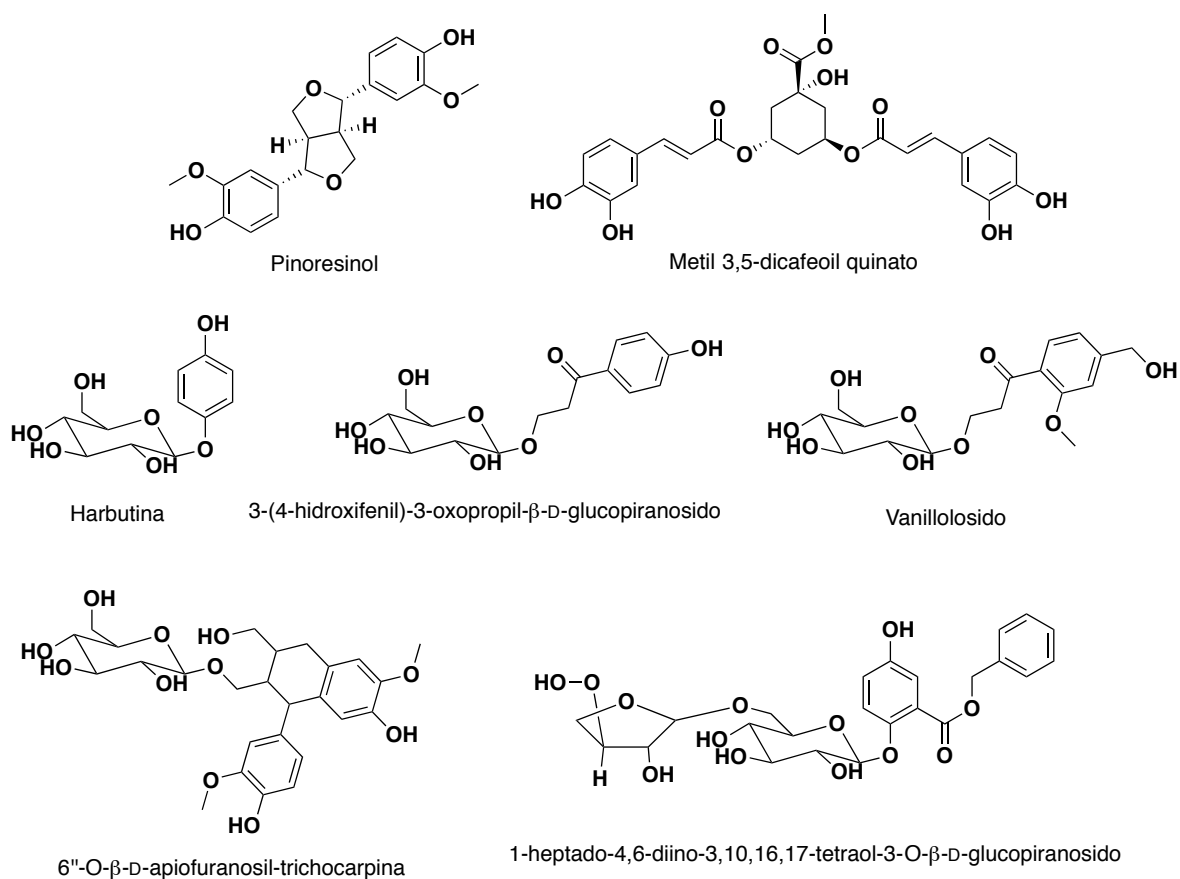


Figura 4. Compuestos fenólicos aislados de las partes aéreas de *Tithonia diversifolia*.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Actividad insecticida y de inhibición de colinesterasa en extractos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

En esta sección se evaluó la actividad insecticida, mediante ingestión y contacto, de extractos de las hojas de *Tithonia diversifolia* obtenidos con diferentes disolventes, sobre obreras de *A. cephalotes* aisladas de colonias de laboratorio. También, se identificó la concentración mínima del extracto con mayor efecto tóxico. Finalmente, como complemento, teniendo en cuenta que algunos metabolitos secundarios como alcaloides, terpenoides, flavonoides, cumarinas y lignanos aislados de plantas son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa⁵⁸, se planteó evaluar la actividad inhibitoria de colinesterasas de los extractos de *T. diversifolia*, con el fin de relacionar los dos tipos de actividades.

1.3.1.1 Evaluación de la actividad insecticida sobre *Atta cephalotes*

1.3.1.1.1 Toxicidad de DMSO y CMC sobre obreras de *A. cephalotes*

En términos generales, los análisis de devianza revelaron diferencias significativas entre al menos dos de las sustancias evaluadas, además, que el tiempo tiene un efecto relevante sobre la mortalidad de las hormigas para los experimentos de ingestión y contacto (Anexos-Tabla 1.1 y 2.1). Los resultados de la prueba de contrastes múltiples por pares (ver descripción en anexos) en los ensayos de ingestión, mostraron que el DMSO a concentraciones de 1% y 3% difieren de las demás y entre ellas mismas (Anexos-Tabla 1.2). Estas concentraciones provocan la mayor mortalidad en hormigas en comparación con DMSO al 0.5% y con el CMC al 0.5 y 0.25%. Por su parte, las sustancias CMC 0.25%, CMC 0.5% y DMSO 0.5% no difirieron significativamente del control (Fig. 5A), siendo CMC a 0.25% la concentración menos tóxica para las hormigas (Anexos-Tabla 1.2).

En los ensayos de contacto, el DMSO fue la sustancia más tóxica en concentraciones de 0.5, 1 y 3% generando mayor porcentaje de mortalidad de hormigas (Anexos-Tabla 2.2). Los resultados de contrastes múltiples por pares indicaron que no existen diferencias significativas entre las concentraciones 0.5, 1 y 3% de DMSO, pero estas sí con respecto al

control. Las dos concentraciones de CMC presentaron resultados similares al control (Fig. 5B). Estos resultados mostraron que el DMSO es altamente tóxico para ser usado como blanco en evaluaciones de actividad insecticida. La CMC a 0.25% es la concentración máxima y menos tóxica contra obreras de *A. cephalotes*. Por esta razón, se decidió solubilizar los extractos de *T. diversifolia* con CMC usando concentraciones más bajas de 0.25% para los bioensayos de ingestión y contacto.

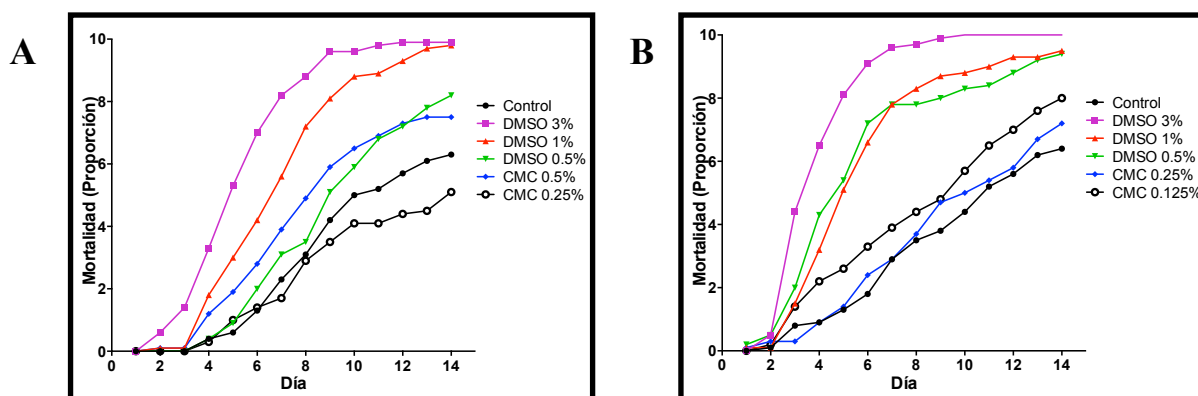


Figura 5. Toxicidad de DMSO y CMC en el tiempo. A) Experimento de ingestión. B) Experimento de contacto.

1.3.1.1.2 Actividad insecticida de extractos de *Tithonia diversifolia*

El análisis preliminar por CCD mostró que la composición de algunos extractos eran similares (ver imagen 1 en anexos). El perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo Td 2.2 fue intermedio entre los extractos de diclorometano Td 2.1 y *n*-butanol Td 2.3, a su vez, el extracto de *n*-butanol Td 2.3 presentó un perfil cercano al del residuo acuoso Td 2.4. Por esta razón, se escogieron solo los extractos de *n*-hexano Td 1, acetona al 70% Td 2, diclorometano Td 2.1 y residuo acuoso Td 2.4, para ser evaluados contra las hormigas cortadoras de hojas (Fig. 1-Anexos).

En el experimento de ingestión usando extractos de *T. diversifolia* a 1000 ppm, los análisis de devianza mostraron que existen diferencias significativas entre al menos dos de los extractos evaluados y, además, el tiempo tiene un efecto relevante sobre la mortalidad de las

hormigas (Anexos-Tabla 3.1). La prueba de contrastes múltiples por pares mostró que el extracto de diclorometano Td 2.1 tiene diferencias significativas con los otros tratamientos excepto el extracto de *n*-hexano Td 1 (Anexos-Tabla 3.2). Por el contrario, el extracto de *n*-hexano Td 1 no presentó diferencias significativas frente a los demás extractos como tampoco frente al blanco y al control. Cabe resaltar que el extracto de acetona al 70% Td 2, del cual proviene el extracto de diclorometano Td 2.1, no tuvo la misma toxicidad. Además, el extracto de residuo acuoso Td 2.4 se comportó como el control. El extracto en diclorometano Td 2.1 fue el más promisorio como insecticida, al causar la mayor mortalidad de obreras en menor tiempo: 70% en cinco días y, aproximadamente, el 90% al séptimo día (Fig. 6).

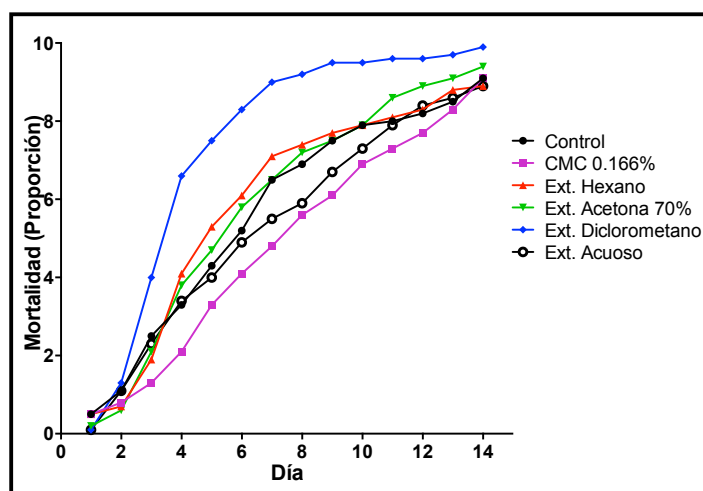


Figura 6. Efectividad de extractos en diferentes solventes de *T. diversifolia* mediante ingestión.

En extractos de *T. diversifolia* se han aislado tanto metabolitos secundarios tipo sesquiterpenlactonas, diterpenos, flavonoides y esteroides^{17, 37, 57} como otras clases de metabolitos secundarios como fitosteroides, xantanos, cumarinas, ceramidas, cromonas y cromenos⁵⁹⁻⁶⁰. Diversos estudios biológicos han demostrado que estos compuestos tienen, entre otras, actividad insecticida y repelente¹⁷ en su mayor parte debida a las sesquiterpenlactonas presentes en grandes cantidades en la familia Asteraceae.

Durante la extracción con hexano, se extraen compuestos de baja polaridad tipo alcanos, alcoholes grasos, otros hidrocarburos lineales, también triterpenoles y esteroides; mientras que ácidos grasos, ésteres, terpenos de tipo sesquiterpenos, terpenoides, fenil propanoides, entre otros se extrajeron con la mezcla acetona:agua 7:3. En contraste, la extracción con

diclorometano si bien extrae compuestos afines a los del extracto de *n*-hexano Td 1, la mayor parte de ellos, son los de mediana polaridad extraídos durante la extracción con acetona al 70% Td 2. El residual lipídico arrastrado por el diclorometano probablemente influya en la forma cómo los metabolitos secundarios fenólicos y sesquiterpénicos son percibidos por un insecto. Por ello, al estar aislados y concentrados en el extracto de *n*-hexano Td 1 no intensifican su actividad. Los compuestos que contienen las fracciones lipídicas de algunos extractos de plantas han mostrado actividad repelente contra hormigas cortadoras de hojas, muchos de estos pertenecen a los terpenoides¹⁹. Otros estudios demuestran que extractos de lípidos epicuticulares tienen efectos aleloquímicos, en cuanto a fagoinhibición o toxicidad. Estos componentes han sido relacionados con la resistencia de plantas a los herbívoros⁶¹.

Por otro lado, las dietas suministradas a las hormigas que contenían extracto de diclorometano no fueron ingeridas y/o desmenuzadas, esta conducta no se observó en los demás tratamientos. Otro comportamiento inusual fue el adormecimiento de las hormigas, evidenciado por la falta de movimiento e inactividad dentro de la caja Petri. Estas observaciones nos permiten sospechar que la actividad insecticida del extracto de diclorometano de *T. diversifolia* puede ocasionar en las hormigas un efecto antiherviboria. Estos cambios de comportamiento fueron más intensos con el paso de los días del experimento.

En la literatura se encuentran reportes de extractos clorofórmicos de otras Asteraceae, ricos en terpenoides, que presentan actividad repelente contra hormigas cortadoras de hojas⁶², mostraron dicha actividad los extractos de hojas y tallos de *Melampodium divaricatum* contra hormigas de *A. cephalotes* en colonias de laboratorio. Igualmente, Okunade y Wiemer⁶³ encontraron que el extracto de las hojas de *Eupatorium quandrangulare*, rico en sesquiterpenlactonas, presentaba actividad repelente contra individuos de esa especie de *A. cephalotes*.

Por otra parte, Ambrosioy col.⁴⁴ proporcionaron evidencia de la actividad antialimentaria o disuasora del extracto de diclorometano de las hojas de *T. diversifolia*, al mostrar que las larvas de *Chlosyne lacinia* evitan las sesquiterpenlactonas de tricomas glandulares. Además,

aislaron 14 sesquiterpenlactonas, un flavonoide y un diterpenoide. Los extractos acuosos y etanólicos de esta planta también presentaron actividad insecticida sobre *Macrotermes bellicosus* (Termitidae)⁶⁴. Adedire and Akinneye⁶⁵ encontraron que extractos etanólicos de *T. diversifolia*, afectan negativamente la oviposición, emergencia de adultos y sobrevivencia de *Callosobruchus maculatus*.

Oyewole y col.⁶⁶ encontraron que el aceite esencial de *T. diversifolia* tiene efecto repelente sobre el mosquito *Anopheles gambiae*, provocada por los volátiles presentes en la planta. En este sentido, Dai y col.⁶⁷ reportaron los principales constituyentes del aceite esencial obtenido por hidrodestilación, la composición fue abundante en monoterpenos 52%, hidrocarburos sesquiterpénicos 22.7%, y sesquiterpenos oxigenados 11.8%.

La actividad insecticida de *T. diversifolia* obtenida con el extracto de diclorometano Td 2.1 por el método de ingestión en obreras aisladas de colonias de laboratorio, podría atribuirse a la presencia de sesquiterpenlactonas y compuestos terpénicos mencionados anteriormente⁴⁴, los cuales pueden ser responsables de actividad repelente e insecticida. En otras palabras, estos compuestos son las armas químicas, usualmente poderosas, que plantas como *T. diversifolia* producen y utilizan en defensa a herbívoros. Estas fitotoxinas pueden ser liberadas de las plantas por volatilización, exudación de la raíz, lixiviación y descomposición del material vegetal⁵⁰. Por ello, se requiere realizar separación fitoquímica de este extracto para concluir en la identificación de las sustancias activas. No obstante, se ha evidenciado que los componentes de menor abundancia también contribuyen a la actividad biológica, reflejando la importancia de la complejidad composicional en conferir bioactividad⁶⁸. Este es el caso de mezclas complejas presentes en el extracto de diclorometano Td 2.1. Existe la hipótesis, en la cual un fenómeno sinérgico entre los metabolitos secundarios puede resultar en una mayor bioactividad en comparación a los compuestos aislados⁶⁹. Esto ocurre, debido a que las plantas generalmente presentan defensas como un conjunto de compuestos más no como individuales⁶⁸. Así, los resultados del experimento de ingestión permiten ordenar los extractos de acuerdo a su actividad insecticida (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad insecticida de extractos de *T. diversifolia* aplicados mediante ingestión.

Actividad Insecticida a 1000 ppm	Ext. Evaluado contra obreras de <i>A. cephalotes</i>
Muy activo	Ext. Diclorometano Td 2.1
Poco activo	Ext. Hexano Td 1
No activos	Ext. Acetona 70% Td 2 y Residuo acuoso Td 2.4

El análisis de la actividad insecticida del extracto de diclorometano a concentraciones inferiores a 1000 ppm (i.e. 500 y 250 ppm), mostró que existen diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas. Ambas concentraciones, antes de 9 días, causaron el 70% de mortalidad en obreras de *A. cephalotes* y sin diferencias significativas. De modo que, la toxicidad del extracto de diclorometano es percibida de igual forma en estas concentraciones. Como resultado, la concentración mínima del extracto de diclorometano a la cual tiene actividad insecticida fue 500 ppm (Fig. 7).

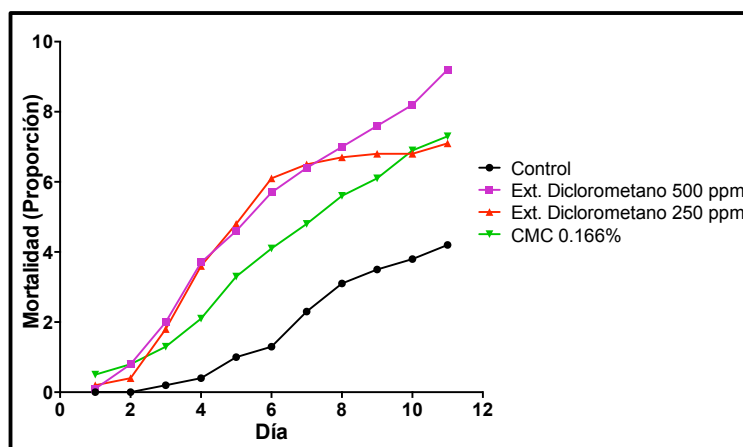


Figura 7. Efectividad del extracto de diclorometano de *T. diversifolia* a diferentes concentraciones mediante ingestión.

Por último, en el experimento de contacto con extractos de *T. diversifolia* a una concentración de 1000 ppm la mortalidad fue igual al transcurrir los días y no se evidenció una tendencia (Anexos-Tabla 4.1 y 4.2.). Ninguno de los extractos de *T. diversifolia* provocó mortalidad en obreras de *A. cephalotes* (Fig. 8). Los resultados de este estudio indican que se debe de evaluar de nuevo los extractos a una concentración mayor de 1000 ppm.

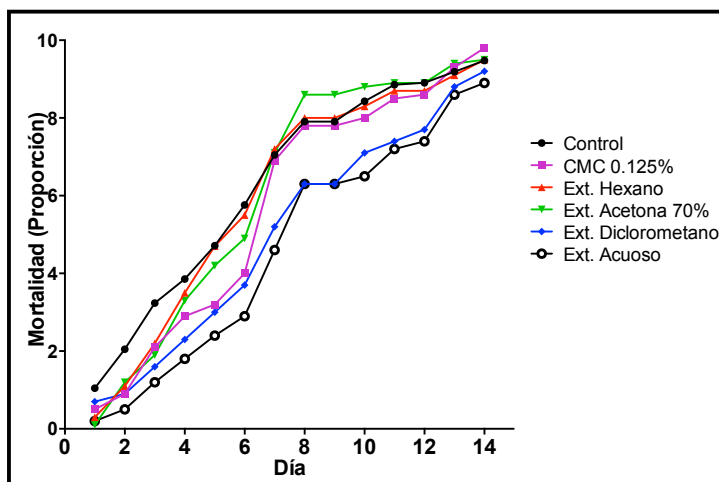


Figura 8. Efectividad de los extractos en diferentes solventes de *T. diversifolia* mediante contacto.

1.3.1.2 Actividad inhibitoria sobre colinesterasas

Los resultados de la Tabla 2, muestran marcada selectividad por acetilcolinesterasa (AChE) y nula inhibición en butirilcolinesterasa (BuChE) para los diferentes extractos y fracciones, aunque un efecto contrario, lo presentó Td 2 (acetona al 70%) con mejor actividad sobre BuChE. Todos los extractos y fracciones evaluados lograron inhibir el 50% de la actividad enzimática de AChE. Los extractos de diclorometano Td 2.1 y acetato de etilo Td 2.2 presentaron un IC_{50} muy cercanos. Los resultados de IC_{50} de las fracciones del extracto de diclorometano Td 2.1 son similares y mayores a 100 $\mu\text{g/mL}$, el valor más bajo de IC_{50} 117.72 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo con la fracción Td 2.1.3. Esto demuestra que la actividad inhibitoria de AChE disminuyó al realizar el fraccionamiento.

Tabla 2. Actividades inhibitorias de colinesterasas (AChE y BuChE) de extractos y fracciones de *T. diversifolia*.

Extracto	Peso (mg)	AChE IC₅₀ (µg/mL)	BuChE IC₅₀ (µg/mL)
Td 1 Ext. Hexano	19.13×10 ³	260.57±0.001	>500*
Td 2 Ext. Acetona 70%	101.10×10 ³	109.2±12.18	60.6±12.17
Td 2.1 Ext. CH ₂ Cl ₂	10.60×10 ³	73.9±11.06	>500*
Td 2.2 Ext. AcOEt	2.05×10 ³	65.6±9.06	>500*
Td 2.3 Ext. BuOH	5.25×10 ³	105.0±18.13	>500*
Td 2.4 Ext. Residuo acuoso	42.57×10 ³	130.5 ±12.23	>500*
Td 2.1.1	45.1	>500*	>500*
Td 2.1.2	936.1	144.5±0.02	>500*
Td 2.1.3	784.5	117.72±0.005	314.6±0.009
Td 2.1.4	2783.5	155.64±0.005	>500*
Td 2.1.5	776.4	186.77±0.003	>500*
Td 2.1.6	1893.7	119.0±0.02	>500*
Galantamina		0.54 µM ± 0.7	8.80 µM ± 0.5

*Valores no determinados, IC₅₀ >500 µg/mL

La transmisión de impulsos nerviosos está regulada por la enzima acetilcolinesterasa AChE, presente en los tejidos nerviosos de humanos e insectos. La inhibición de esta enzima provoca acumulación de acetilcolina en la unión sináptica, y en consecuencia ocurre la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos, evidenciado por actividades convulsivas de los músculos e incluso parálisis, así como otras características de auto-envenenamiento por exceso de acetilcolina⁷⁰⁻⁷¹.

A pesar de que ambas glicoproteínas (AChE y BuChE) hidrolizan ésteres de colina en la sinapsis nerviosa, la principal diferencia radica en su composición y tamaño del sitio activo. Los residuos de aminoácidos son los responsables de la especificidad inhibitoria de AChE y BuChE. Existen diferentes compuestos que pueden unirse a cualquiera de los subsitios del centro activo de la AChE o de la BuChE e inhibirlos específicamente, tales como el BW284C51 (bromuro de 1,5-bis(4-dialildimetilamonio fenil)pentan-3-ona) para el subsitio aniónico de la AChE; y el *iso*-OMPA (tetraisopropil pirofosforamida), etopropazina y bambuterol para la BuChE⁷². Pero el uso de algunos compuestos sintéticos ha provocado la aparición de resistencia en algunos insectos, como resultado de las modificaciones de la

AChE⁷³⁻⁷⁴. Según reportes bibliográficos, metabolitos secundarios de plantas como los terpenoides tienen acción anticolinesterasa^{71, 75}. En respuesta a esta problemática, algunas investigaciones se han interesado en el uso de productos naturales que presenten actividad insecticida, compuestos tales como alcaloides (isoquinolínicos, indólicos, piperidínicos, triterpenoidicos), terpenos como monoterpenos, sesquiterpenos y derivados, diterpenos, triterpenos, lactonas esteroidales, flavonoides y derivados, cumarinas, estilbenoides, fenilpropanoides y compuestos fenólicos han mostrado una fuerte actividad inhibitoria de la AChE^{73, 76-77}.

A partir de los resultados es posible inferir que existe una inhibición dual generada únicamente por el extracto crudo de acetona al 70% Td 2 y que al hacer el fraccionamiento líquido-líquido, la inhibición pasa a ser específica para AChE, debido a los metabolitos existentes en los diferentes extractos de *T. diversifolia*. Esta hipótesis está sustentada sobre los valores de $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ para BuChE, los cuales demuestran que no se logró una inhibición enzimática significativa, probablemente porque los compuestos no ingresan al sitio activo en BuChE. La mejor inhibición de la enzima AChE se obtuvo con los extractos de diclorometano Td 2.1 y acetato de etilo Td 2.3 de *T. diversifolia*, estos presentaron los valores más bajos y próximos de IC_{50} en comparación a los demás extractos evaluados, 73.92 y 65.63 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, por ello son interesantes para el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios, con proyección a evaluar la actividad AChE en fracciones depuradas y establecer diferencias entre las mediciones de sus respectivos extractos. La actividad inhibitoria de AChE obtenida en las fracciones de Td 2.1 demuestra que la inhibición disminuyó al realizar el fraccionamiento, indicando que la actividad se potencializa cuando se usa el extracto crudo.

1.3.2 Aislamiento, identificación, elucidación estructural y actividad antioxidante de compuestos fenólicos en extractos de hojas de *Tithonia diversifolia*

En esta sección, se evaluó la actividad antioxidante de extractos de hojas de *Tithonia diversifolia* obtenidos con diferentes disolventes de polaridad creciente, mediante capacidad captora de radicales libres (CCR) de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Posteriormente, se realizó el aislamiento guiado con esta actividad, de un nuevo derivado de ácido cafeico, ácido (*E*)-3-(((3-(3,4-dihidroxifenil)acrililoil)oxi)metil)-2-metiloxirane-2-carboxílico (**1**) y seis ácidos fenólicos conocidos, ácido 4,5-di-*O*-dicafeoilquínico (**2**), ácido 3,4-di-*O*-dicafeoilquínico (**3**), ácido 3,5-di-*O*-dicafeoilquínico (**4**), ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**5**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**6**) y ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**7**) a partir del extracto butanólico de *T. diversifolia*. La elucidación estructural de los compuestos se logró mediante el análisis de datos espectrales (UV-Vis, HPLC-ESI-MS, RMN ¹H, RMN ¹³C y RMN-2D). El compuesto **1** fue comparado con el ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treonico (**8**)⁷⁸, el cual podría ser el precursor biogénico. La actividad antioxidante se correlacionó con la estimación del contenido total de fenoles (CTF) en cada extracto y fracción, así mismo, se determinó el poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) a los compuestos puros.

1.3.2.1 Capacidad captora de radicales DPPH y contenido total de fenoles en extractos de *Tithonia diversifolia*

Los antioxidantes pueden retardar o inhibir la oxidación de lípidos u otras biomoléculas, por que intervienen en pasos de iniciación o propagación en reacciones de cadena⁷⁹. Los radicales libres están presentes en algunas de estas reacciones y son unos de los causantes del estrés oxidativo, sin embargo, los radicales pueden ser inhibidos por diversos antioxidantes naturales, por ello, es interesante realizar ensayos de capacidad antioxidante sobre extractos naturales.

El análisis mediante CCD (ver imagen 2 en anexos), mostró que los extractos polares obtenidos de la especie *Tithonia diversifolia* poseen una potente capacidad antioxidante en términos de capacidad captora de radicales DPPH. La habilidad para atrapar o captar los radicales DPPH de los distintos extractos, también se investigó a varias concentraciones con

el objetivo de determinar los valores de FRS₅₀ (free radical scavenging por sus siglas en ingles). Como se observa en la figura 9, todos los extractos mostraron efecto dosis-dependiente. El extracto de acetato de etilo (Td 2.2) y butanólico (Td 2.3) muestran un comportamiento similar a los controles (quercetina y vitamina C), el extracto Td 2.2 tiene una capacidad más alta que el extracto Td 2.3 a concentraciones menores de 50 mg/L, sin embargo, a concentraciones mayores de 100 mg/L, la actividad de Td 2.3 es mayor, esto explica porque los valores del FRS₅₀ para los dos extractos son cercanos.

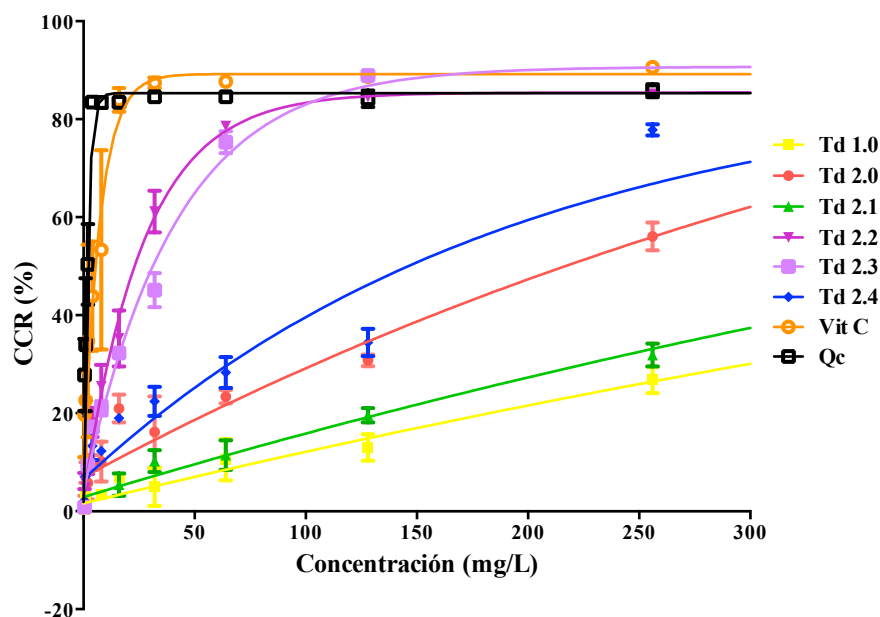


Figura 9. CCR-DPPH dependiente de la concentración de extractos de *T. diversifolia*.

En general, los resultados mostraron valores de FRS₅₀ entre 23.0 y 443.7 mg/L para los extractos de *T. diversifolia*. Los valores más bajos de FRS₅₀, significan más alta actividad antioxidante, así, los extractos Td 2.2 (23.0 mg/L) y Td 2.3 (30.9 mg/L) se consideraron los de mayor actividad captora de radicales. Además, los resultados del contenido total de fenoles van desde 12.3 de mg AG/g ES para Td 1.0 hasta 140.6 mg AG/g ES para Td 2.4 (Fig. 10), siendo los extractos Td 2.3 y Td 2.4 (132.8 y 140.6 mg AG/g ES respectivamente) los de mayor CTF. Por lo tanto, al realizar la comparación de los extractos que presentaron la mejor actividad antioxidante y el más alto CTF, se seleccionó el extracto butanólico Td 2.3 para realizar el fraccionamiento biodirigido.

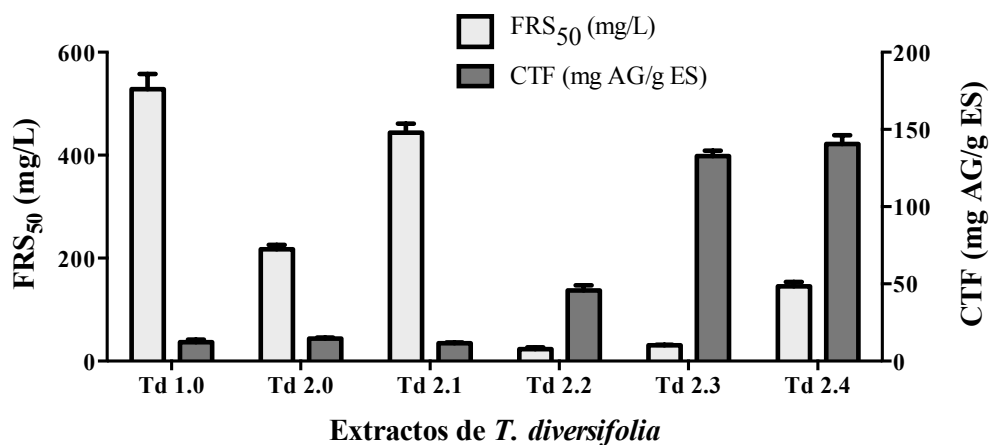


Figura 10. Comparación entre los FRS₅₀ y CTF de los extractos de *T. diversifolia*.

1.3.2.2 Aislamiento de derivados de ácido cinámico guiado por capacidad antioxidante

Zhao y col.⁸⁰ reportaron previamente que extractos polares de *Tithonia diversifolia* son ricos en distintos compuestos fenólicos. Por ello, se utilizó una metodología alternativa para obtener diferentes extractos de las hojas de esta planta (Sección 1.4.3). La actividad antioxidante mostrada por el extracto de acetona:agua 7:3 (Td 2), condujo hacia el aislamiento guiado de metabolitos secundarios con potencial capacidad antioxidante. Este procedimiento involucró, primero la partición líquido-líquido inicialmente de Td 2, luego, fraccionamiento mediante cromatografía de columna de las fracciones más activas, análisis por HPLC-DAD y, por último, aislamiento de compuestos mediante HPLC semipreparativo (Fig. 11). La selección de las fracciones para aislamiento con HPLC semipreparativo, se realizó teniendo en cuenta la cantidad de masa, capacidad captora de radicales DPPH, CTF y perfil cromatográfico obtenido con HPLC-DAD.

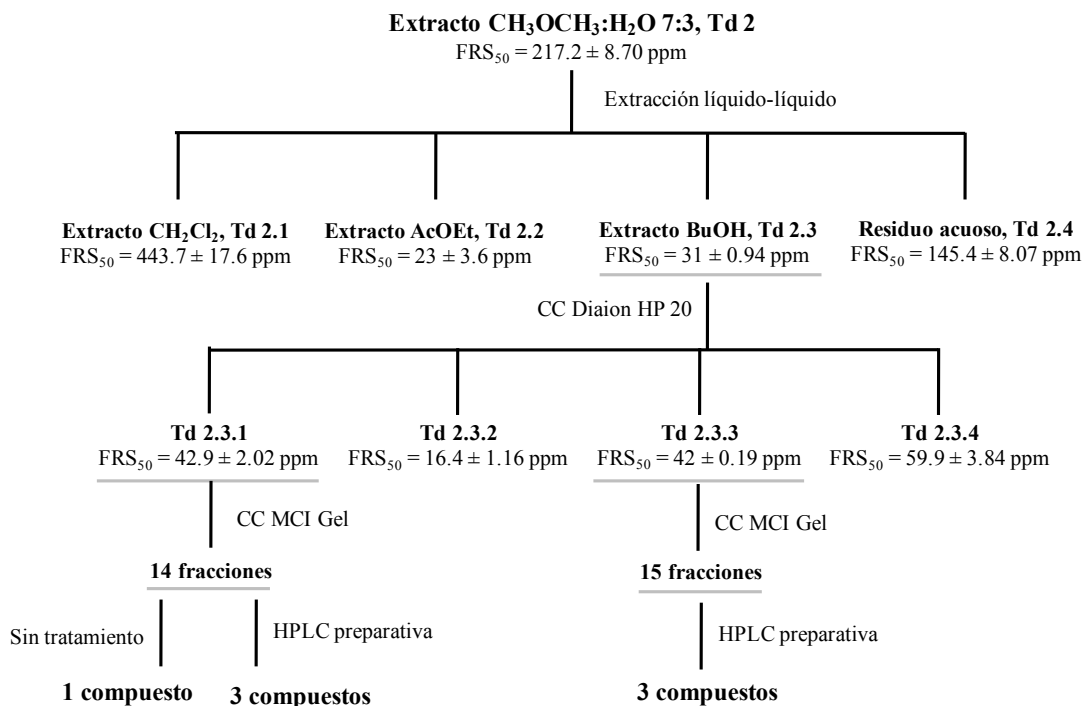


Figura 11. Aislamiento de compuestos guiado por capacidad antioxidante.

El fraccionamiento de Td 2.3 por cromatografía de columna sobre Diaion HP-20 (resina polimérica de estireno-divinilbenceno) produjo cuatro fracciones, siendo Td 2.3.1 y Td 2.3.3 las fracciones de mayor masa (Anexos-Fig.2). La actividad antioxidante de las fracciones se encuentra por debajo de 60 mg/L, y el menor CTF lo presenta la fracción Td 2.3.4 (69.4 ± 1.22 mg AG/g ES) (Fig. 12).

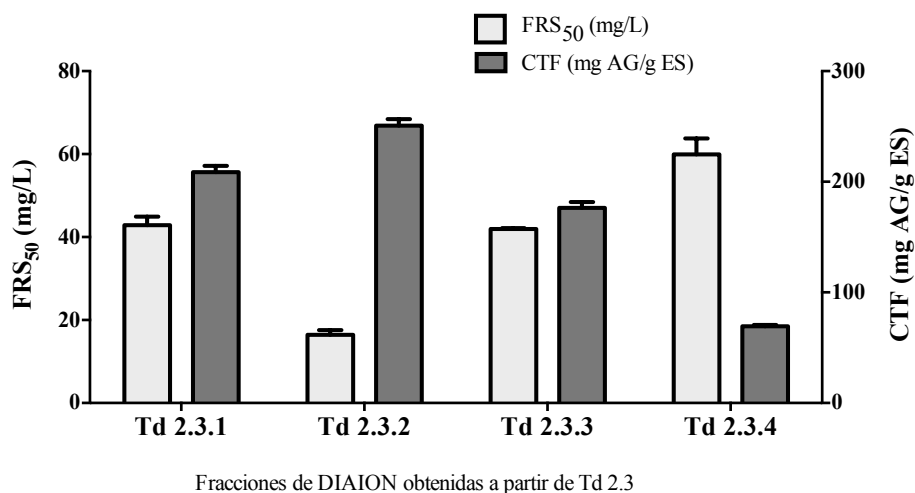


Figura 12. Comparación entre los FRS₅₀ y CTF de fracciones a partir de Td 2.3.

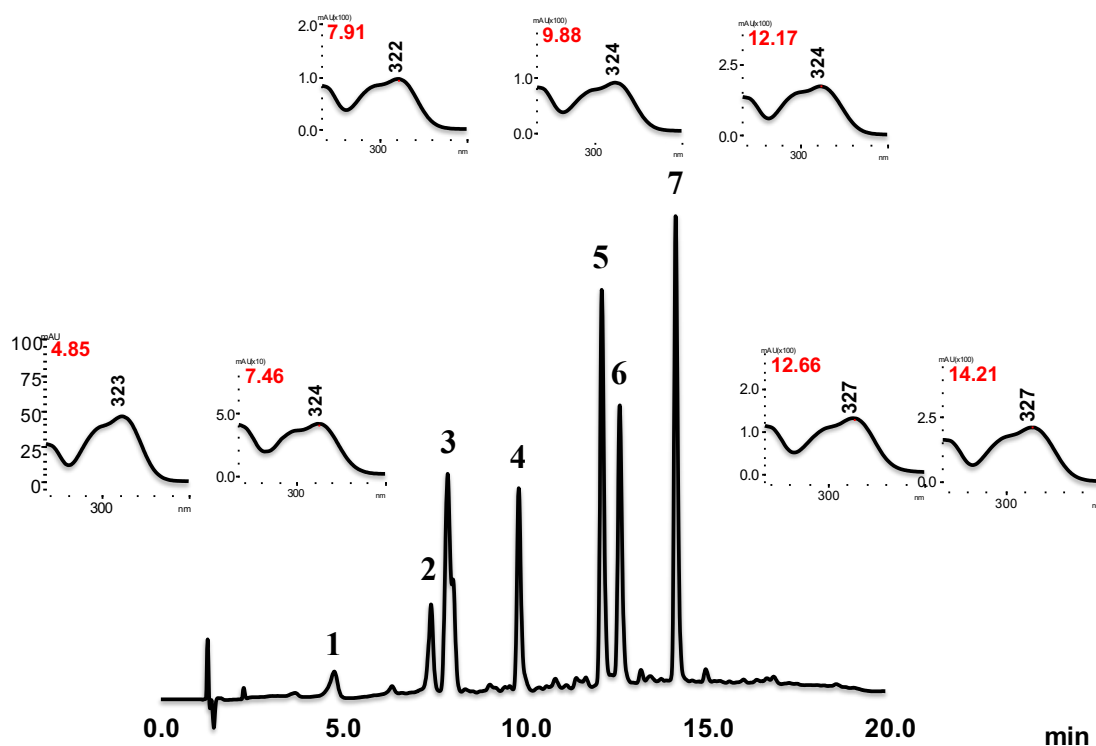


Figura 13. Cromatograma del extracto Td 2.3 de *T. diversifolia*.

El fraccionamiento cromatográfico sobre MCI-Gel CHP20P (resina polimérica de estireno-divinilbenceno) de Td 2.3.3 produjo 15 fracciones. Las masas obtenidas se registran en la figura 3-anexos. Las fracciones Td 2.3.3.2, Td 2.3.3.5, Td 2.3.3.8, Td 2.3.3.10 y Td 2.3.3.15 fueron las de mayor actividad antioxidante, mostrando un FRS_{50} menor a 25 mg/L y un CTF mayor a 189 mg AG/g ES. Por el contrario, la fracción Td 2.3.3.13 produjo la menor actividad antioxidante y el más bajo CTF (Fig. 14).

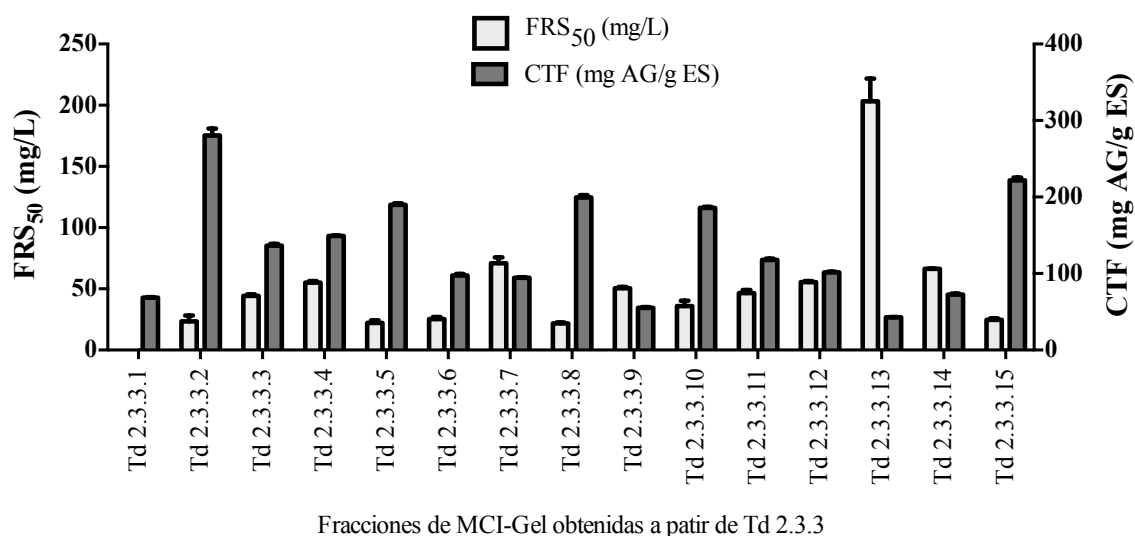


Figura 14. Comparación entre los FRS₅₀ y CTF de fracciones a partir de Td 2.3.3.

De igual forma, el fraccionamiento cromatográfico sobre MCI-gel de Td 2.3.1 produjo 14 fracciones. La distribución en masa se registra en la figura 4-anexos. Las fracciones Td 2.3.1.1-4, Td 2.3.1.8-9 y Td 2.3.1.11-12 mostraron un FRS₅₀ menor a 30 mg/L. Los resultados más altos de CTF (mayores a 160 mg AG/g ES) lo obtuvieron las fracciones Td 2.3.1.1, Td 2.3.1.8, Td 2.3.1.11 y Td 2.3.1.12 (Fig. 15). Estos resultados (CCR-DPPH y CTF) de nuevo indicaron la presencia de compuestos de tipo fenólico, los cuales fueron confirmados con el monitoreo por HPLC-DAD usando diferentes absorbancias ($\lambda = 270, 280, 320, 360$ nm).

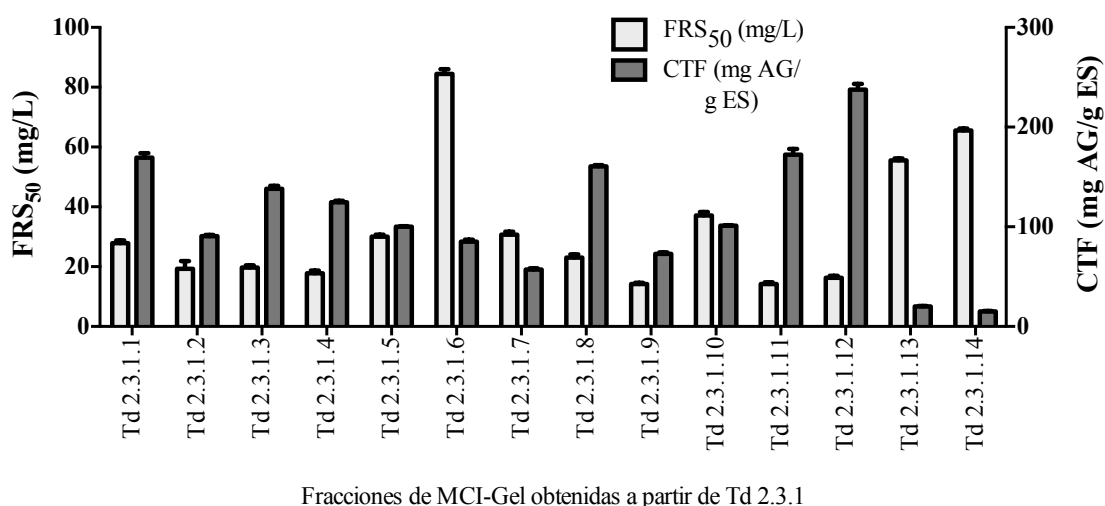


Figura 15. Comparación entre los FRS₅₀ y CTF de fracciones a partir de Td 2.3.1.

Utilizando la técnica de HPLC semipreparativa, se aislaron 7 derivados de ácido cafeico a partir de las fracciones activas de Td 2.3.1 y Td 2.3.3, seis de ellos son ácidos clorogénicos. Los compuestos **1**, **2** y **3** se obtuvieron de Td 2.3.3, mientras **4**, **5**, **6** y **7** de Td 2.3.1 (Fig. 16).

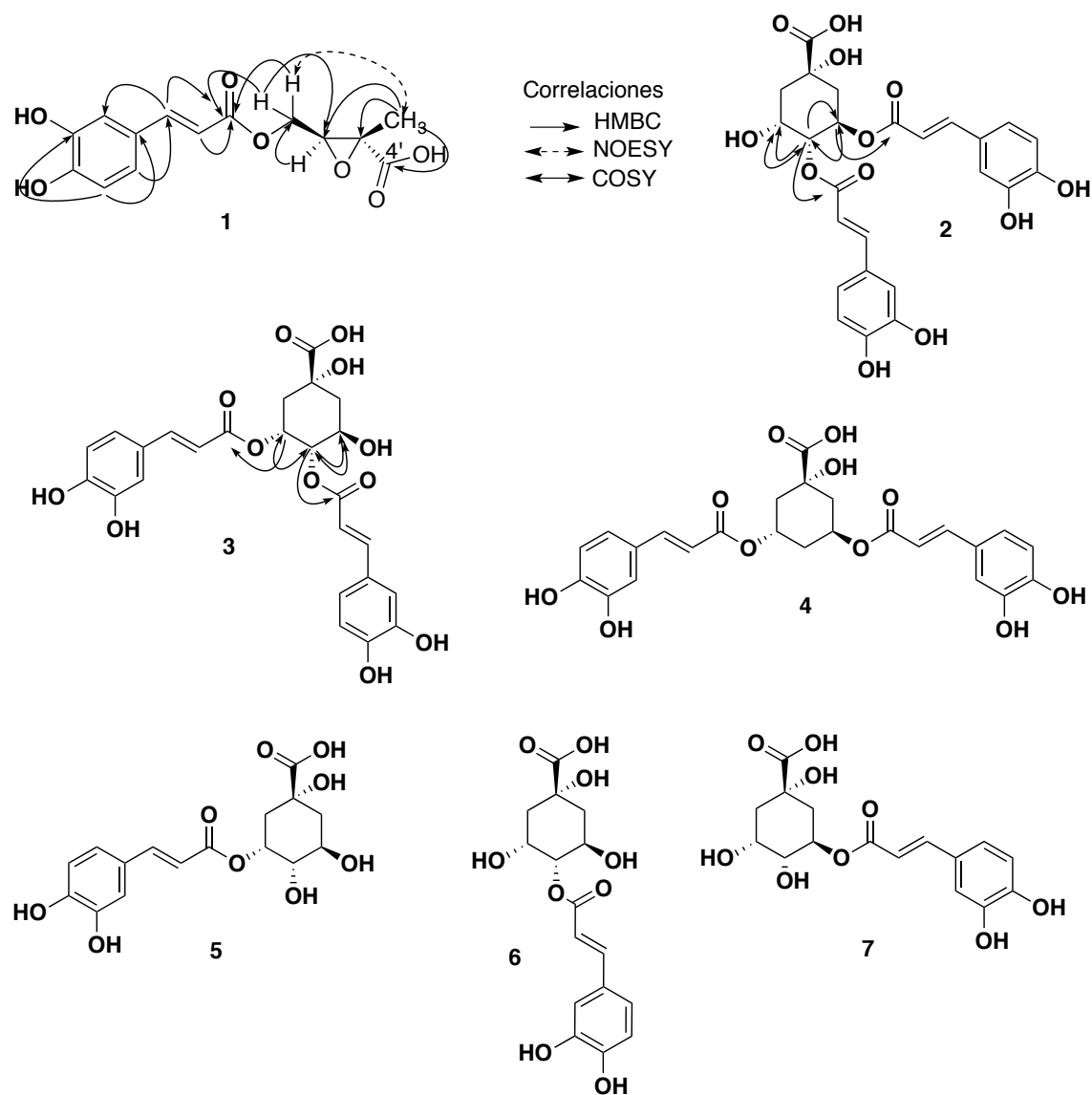


Figura 16. Estructuras propuestas para los derivados de ácidos cafeico aislados a partir del extracto butanólico de *T. diversifolia*.

De la fracción Td 2.3.3.2 se obtuvo el nuevo derivado de ácido cafeico **1** (Fig. 17). El compuesto **1**, se obtuvo en forma de polvo de color amarillo pálido. Los resultados de HPLC-

MS en modo positivo y negativo mostraron los iones pseudo-moleculares a m/z 295 $[M+H]^+$ and 293 $[M-H]^-$ respectivamente, indicando un peso molecular de 294 Da, correspondiente a la formula molecular $C_{14}H_{14}O_7$. En este análisis, se usó formiato de amonio en solución. El cromatograma obtenido (ver anexos) mostró 3 picos en tiempos de retención 5.70, 5.71 y 6.31 min. Los dos primeros picos más abundantes con respecto al último. Los espectros de masas en modo de ionización positiva de los picos a 5.70 y 5.71 min, mostraron un ion m/z 313 $[M+H+H_2O]^+$ correspondiente a los ésteres 4-*O*-cafeoil de ácido *eritro*- y *treo*- 2,3,4-trihidroxi-2-metilbutanoico **8** (Fig. 17) (ver espectros en anexos), los cuales, provienen del ion m/z 295 $[M+H]^+$ que se observó en el pico a 6.31 min, confirmando la existencia del anillo de epóxido en **1**. La espectrometría de masas de ionización por electrospray de alta resolución (HR-ESI-MS) por inserción directa, también confirmó la masa molecular, el cual mostró un pico a m/z 311.0780 (calculado para $[C_{14} H_{14} O_7 -H +H_2O]^-$ apertura de aducto del anillo oxirano, 311.0772) (Fig. 18). Este resultado se justificó por las condiciones ácidas utilizadas para el análisis. La disociación del ácido fórmico y del agua, produce iones hidronio $[H]^+$, los cuales contribuyen a la protonación del anillo de oxirano de **1**. Además, los iones OH^- en solución, se adicionan a los carbonos 2 'o 3', para obtener los dos diastereómeros, *eritro* y *treo* de **8** con igual masa (ver mecanismo en anexos).

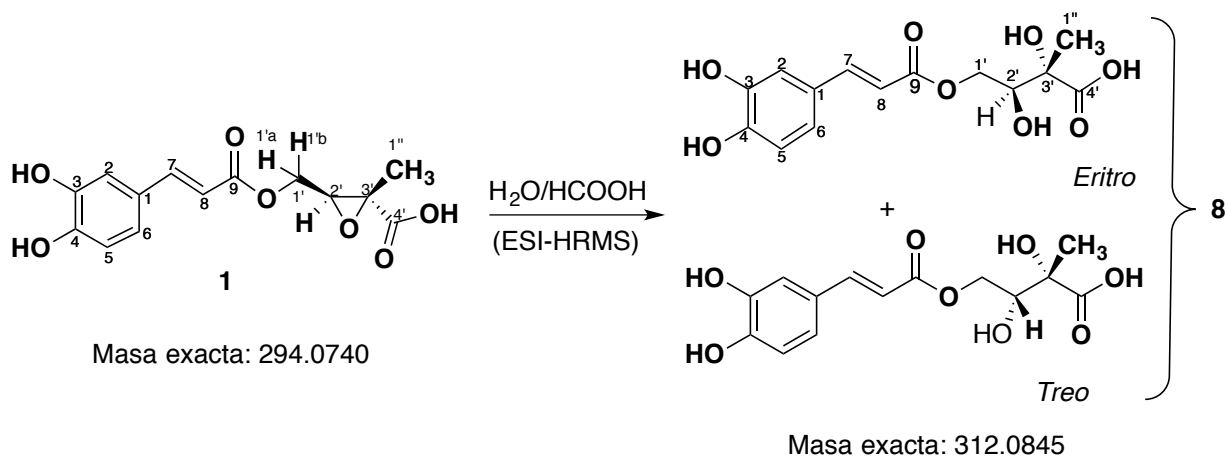


Figura 17. Apertura del anillo oxirano de **1** produciendo los diastereómeros *eritro* y *treo* **8**.

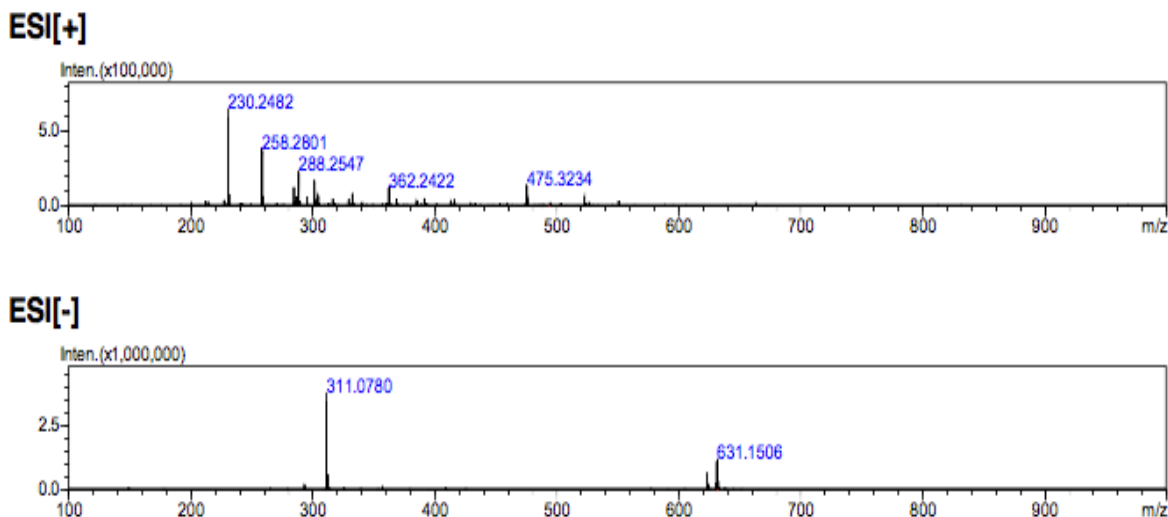


Figura 18. Espectros de HR-ESI-MS en modos positivo y negativo del compuesto **1**.

El espectro de RMN ^1H del compuesto **1**, mostró un sistema aromático ABC a $\delta = 7.05$ (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.95 (1H, dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz) y 6.78 (1H, d, $J = 8.3$ Hz) asignados a los protones H-2, H-6 y H-5 respectivamente. El sistema aromático está conjugado con un doble enlace evidenciado por un par de protones en configuración *trans*, a $\delta = 7.59$ (1H, d, $J = 16.1$ Hz) y 6.29 (1H, d, $J = 16.1$ Hz), asignados a H-7 y H-8, respectivamente. Estos datos indicaron el esqueleto cinámico tipo cafeico. Las demás señales observadas a $\delta = 4.46$ (1H, dd, $J = 11.7, 3.3$ Hz), 4.20 (1H, dd, $J = 11.7, 7.9$ Hz) y 4.05 (1H, dd, $J = 7.9, 3.3$ Hz) corresponden a los protones del metileno puente del residuo epóxido (H-1'_b y H-1'_a) y al protón de oximetina (H-2') respectivamente (Fig. 19). Los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento en combinación con las señales obtenidas para las correlaciones HMBC, COSY y NOESY sugirieron un núcleo de 2-oxirano.

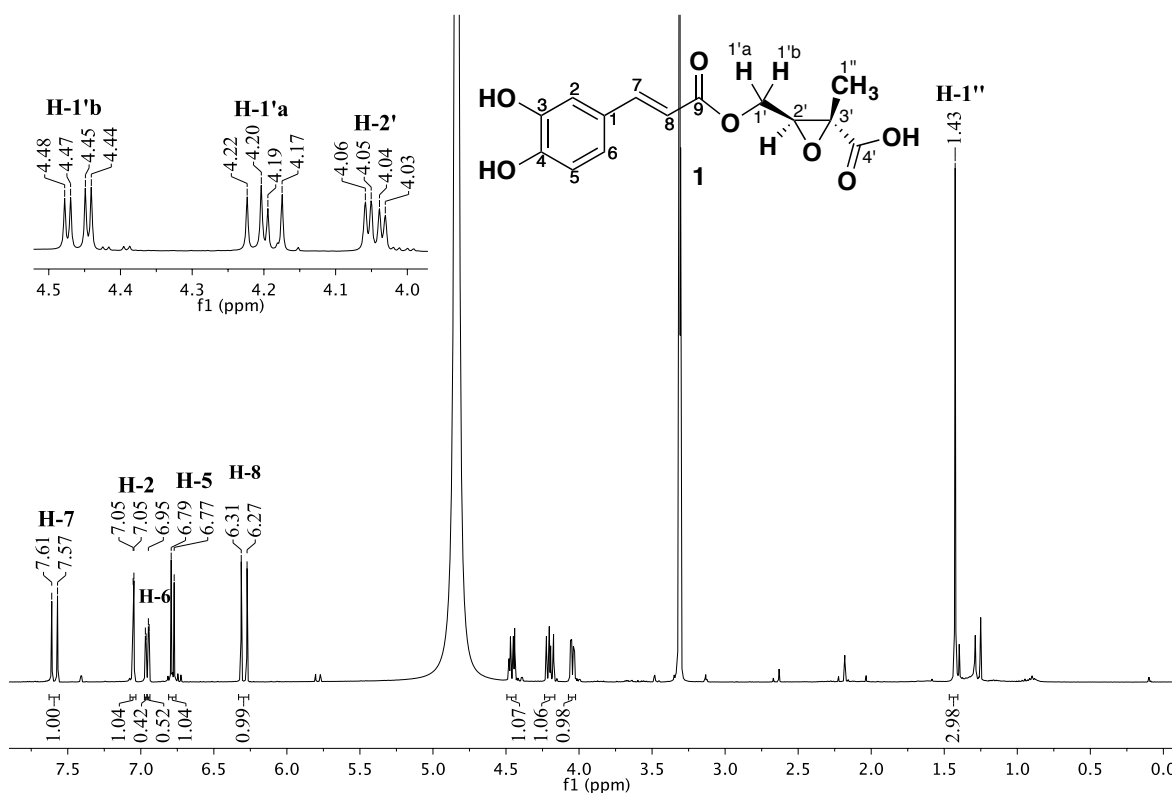


Figura 19. Espectro de RMN ^1H del compuesto **1**, tomado en CD_3OD .

El espectro RMN ^{13}C de **1** mostró 14 señales de carbono, asignadas como dos carbonos carbonilos, cuatro carbonos cuaternarios, un oximetino, un metilo, cinco metinos y metileno puente. Las posiciones de los carbonos (Fig. 20) fueron asignadas con base en los resultados de los experimentos DEPT-135, COSY, HSQC y HMBC. Utilizando HSQC y J -res se confirmó la existencia de los protones diastereotópicos en C-1' ($\delta = 65,93$ ppm).

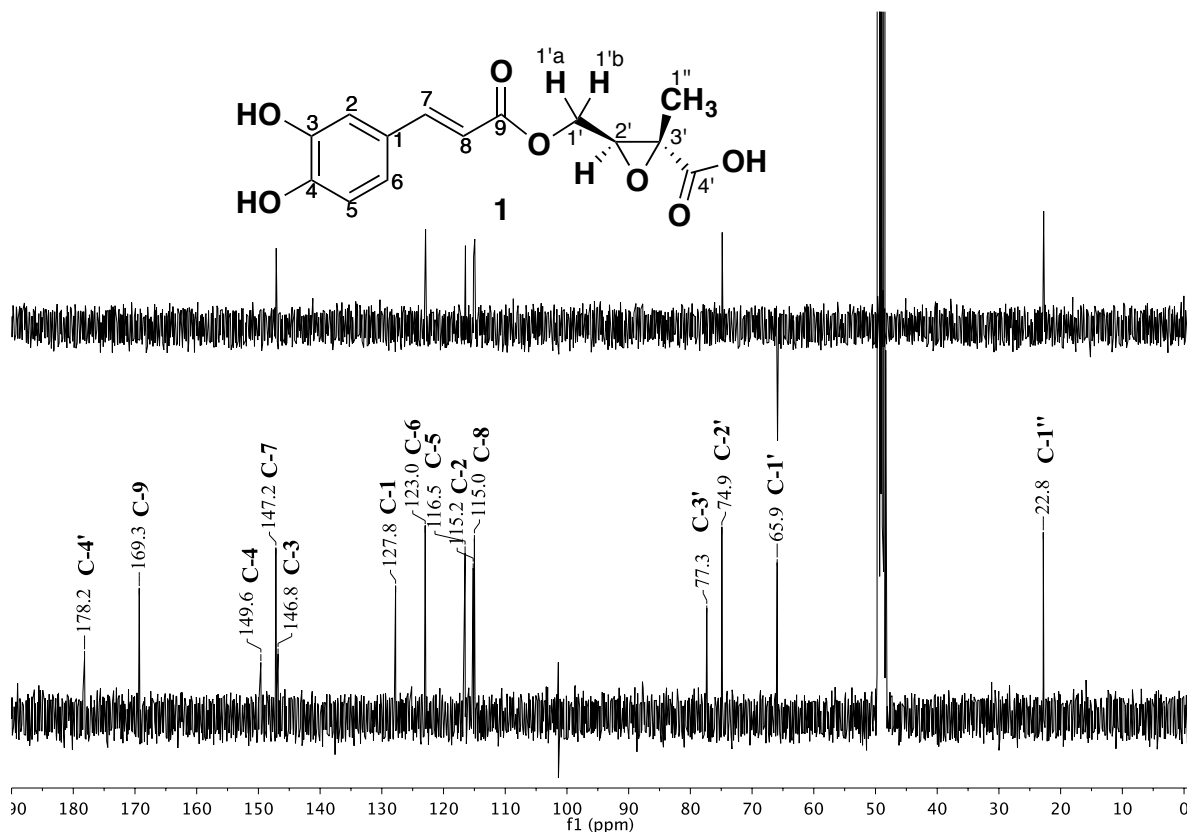


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto **1**, tomado en CD_3OD .

La correlación HMBC entre los protones $\text{H-1}'_b$ y $\text{H-1}'_a$ con el carbono C-9 a $\delta=169.3$ ppm sugirió un enlace éster con ácido hidroxicinámico. De igual forma, la correlación HMBC del protón $\text{H-2}'$ con $\delta=65.93$ (C-1'), así como $\text{H-1}'_a$ con $\delta=74.89$ (C-2'), indicaron la proximidad entre estos dos protones. Además, la correlación a larga distancia entre $\text{H-1}''$ $\delta=1.42$ (C-1'') con un carbono oxirano C-2' ($\delta=74.89$ ppm), junto con otras correlaciones incluyendo C-4' ($\delta=178.17$) y C-3' ($\delta=77.34$ ppm), mostraron la presencia del 3-metil-2-oxirano (Fig. 21).

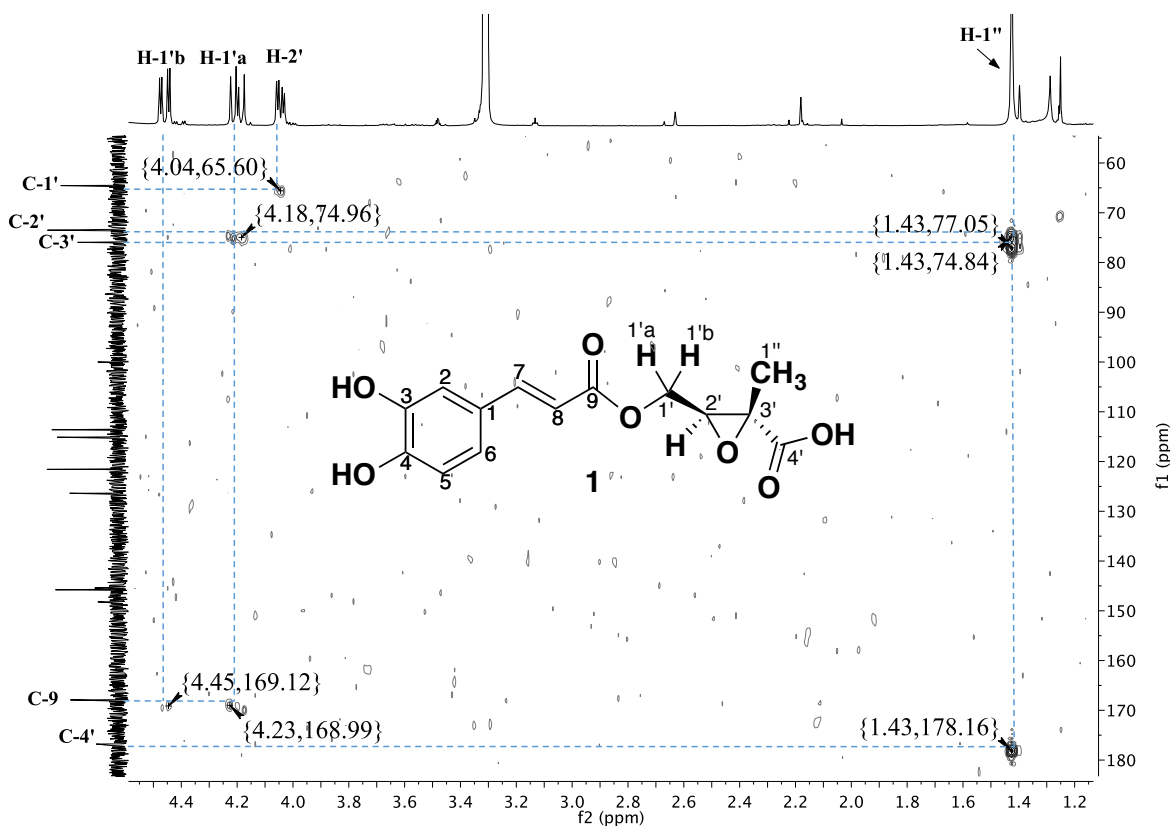


Figura 21. Correlaciones HMBC más importantes para el compuesto **1**.

El espectro NOESY, mostró la correlación espacial entre H-1'' ($\delta = 1.42$ ppm) y el protón H-1'_b $\delta = 4.46$ ppm, y junto a la correlación COSY de H-2' $\delta = 4.05$ ppm con los dos protones del metileno abierto, fue posible la asignación de la posición del anillo de oxirano (Fig. 22). De esta forma, la estructura del compuesto **1** se asignó como ácido (*E*)-3-(((3-(3,4-dihidroxifenil)acrililo)oxi)metil)-2-metiloxirano-2-carboxílico⁸¹.

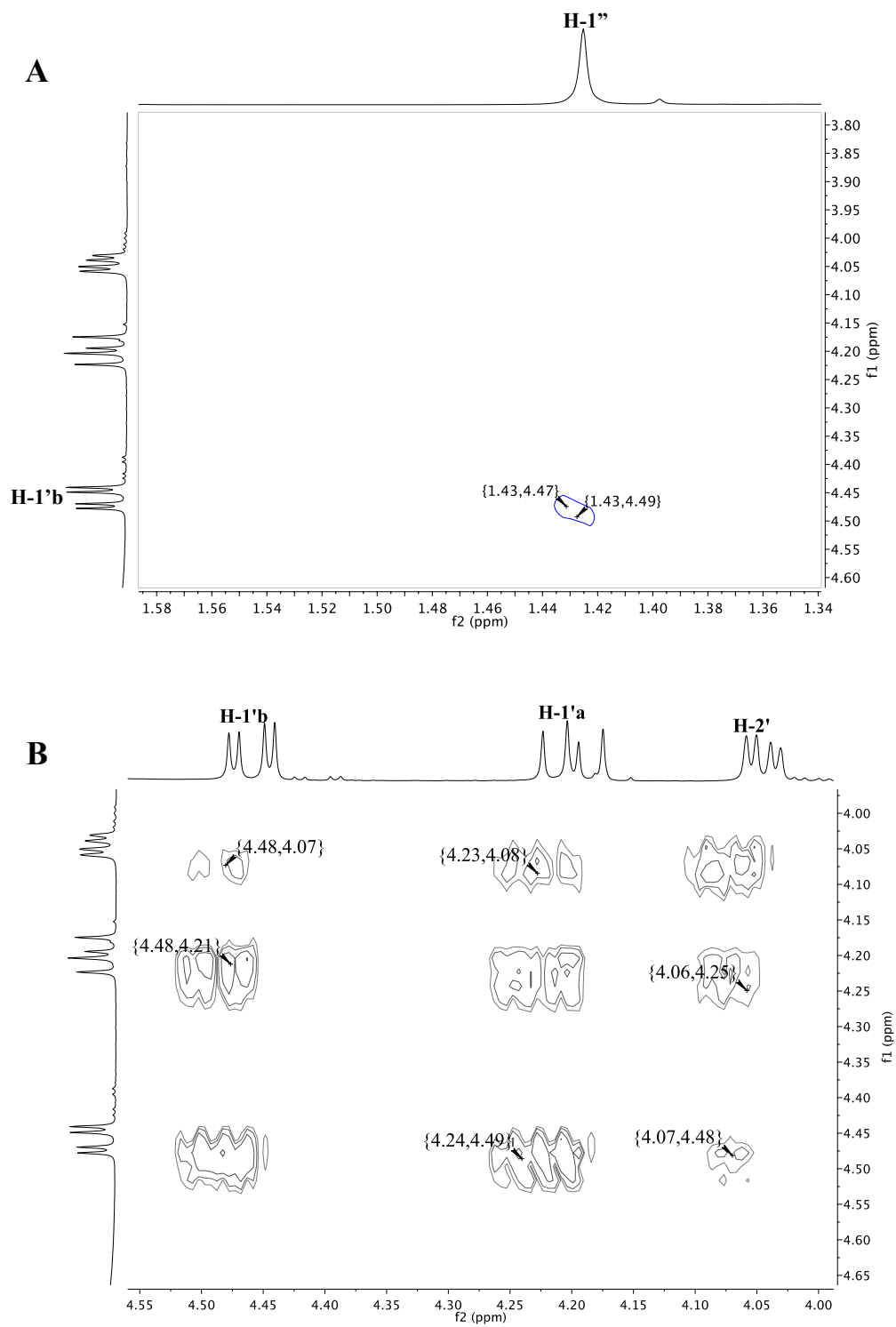


Figura 22. Correlaciones NOESY (A) y COSY (B) más importantes para el compuesto **1**.

Adicionalmente, se compararon los datos espectroscópicos de **1** y **8** (Tabla 3). Los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C mostraron diferencias sutiles, especialmente entre las señales C-1', 2', 3' y 4'. La señal C-3' ($\delta = 77.3$ ppm) del compuesto **1** se desplaza hacia campo bajo con respecto a la señal (C-3', $\delta = 76.9$ ppm) de **8**. Igualmente, la señal C-4' ($\delta = 178.2$ ppm) de **1** se desplaza hacia campo alto en comparación con el compuesto **8** (C-4', $\delta = 179.2$ ppm). Esta comparación y junto a los datos de espectrometría de masas confirmó las diferencias entre los compuestos **1** y **8**.

Tabla 3. Datos de RMN ^1H (J en Hz) y RMN ^{13}C de los compuestos **1** y **8** en CD_3OD (δ ppm, TMS como estándar interno).

Cn	1^{a)}		8^{b)}	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1' _a	65.9	4.20, dd (11.7, 7.9)	66.2	4.20, dd (11.0, 7.5)
1' _b		4.46, dd (11.7, 3.3)		4.45, dd (11.0, 1.5)
2'	74.9	4.05, dd (7.9, 3.3)	75.1	4.0, m
3'	77.3	-	76.9	-
4'	178.2	-	179.2	-
1''	22.8	1.42, s	23.1	1.43, s
1	127.8	-	127.6	-
2	115.2	7.05, d (1.8)	115.2	7.04, d (1.9)
3	146.9	-	146.6	-
4	149.6	-	149.5	-
5	116.5	6.78, d (8.3)	116.3	6.78, d (8.1)
6	122.9	6.95 dd (8.3, 1.8)	122.7	6.95 dd (8.1, 1.9)
7	147.2	7.59, d (16.1)	146.8	7.60, d (15.9)
8	114.9	6.29, d (16.1)	114.9	6.30, d (15.9)
9	169.3	-	169.2	-

^{a)}Compuesto **1**: RMN ^{13}C : 100 MHz y RMN ^1H : 400 MHz. ^{b)}Compuesto **8**⁷⁸: RMN ^{13}C : 125.76 MHz y RMN ^1H : 500.13 MHz.

De otro lado, se aislaron los compuestos **2** y **3** a partir de las fracciones activas antioxidantes Td 2.3.3.5 y Td 2.3.3.15 respectivamente; en cambio, para la obtención del compuesto **4**, no fue necesario usar HPLC-semipreparativo porque la fracción Td 2.3.1.10 mostró un solo compuesto por HPLC-DAD. Los compuestos **5**, **6** y **7** se obtuvieron de las fracciones Td 2.3.1.2 y Td 2.3.1.3. Con base en los datos espectroscópicos RMN y HR-ESI-MS y mediante

comparación con los datos reportados en la literatura⁸²⁻⁸⁹, se determinó que los compuestos **2-4** y **5-7**, son dos grupos de isómeros de posición de ácidos clorogénicos que poseen residuos de ácido cafeico; comparando los espectros de RMN y tiempos de retención de HPLC-DAD, fue posible discriminar entre cada uno de los isómeros. Los compuestos **2**, **3**, y **4** fueron identificados como ácidos 4,5-, 3,4- y 3,5-di-*O*-cafeoilquínicos, y los compuestos **5**, **6** y **7** como ácidos 3-, 4- y 5-*O*-cafeoilquínicos, respectivamente⁸¹. El compuesto **4** ya fue reportado en *T. diversifolia*⁸⁰.

Los compuestos **2**, **3** y **4** se obtuvieron en forma de polvos de color amarillo pálido. La fórmula molecular de los tres isómeros es C₂₅H₂₄O₁₂, correspondiente a un peso molecular de 516 Da. Los resultados de HPLC-MS para el compuesto **2** en modos de ionización positiva y negativa, mostraron evidencia de iones pseudo-moleculares a m/z 517 [M+H]⁺ y 515 [M-H]⁻, respectivamente. El espectro obtenido por HR-ESI-MS en modo de ionización negativa, mostró un pico a m/z 515.1212 (calculado para [C₂₅H₂₃O₁₂]⁻, 515.1195) (Fig. 23), el cual también confirmó la masa molecular de **2**. Del mismo modo, para los compuestos **3** y **4**, se observaron picos a m/z 515.1209 (Fig. 24) y m/z 515.1188 (Anexos- Fig 5), respectivamente. Los espectros ESI-MS² en modo negativo para **2** y **3**, mostraron un pico a m/z 353.0911, correspondiente al ion [M-H-163]⁻ formado por la pérdida de un residuo cafeilo sin oxígeno. Para los distintos isómeros de DiCQA, se encontró que la facilidad de eliminación del residuo de cafeilo durante la fragmentación es 1=5>3>4⁹⁰, acorde con las intensidades obtenidas en los espectros.

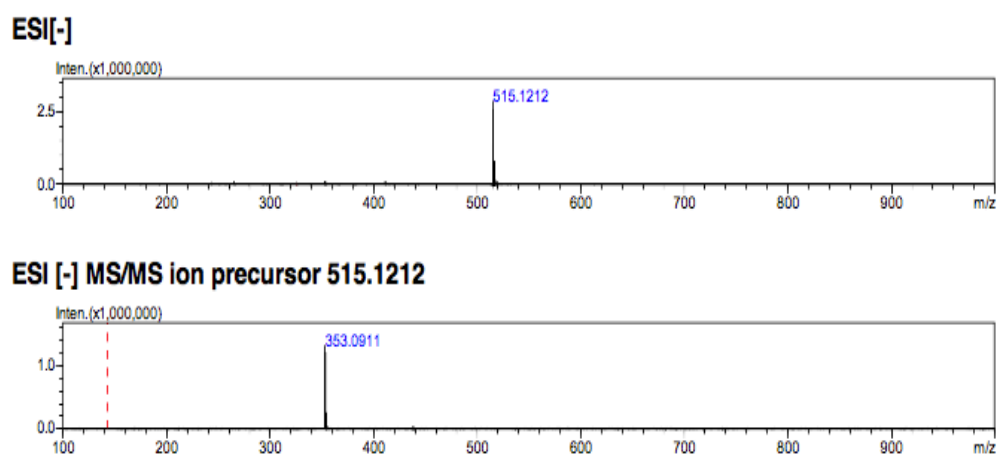


Figura 23. Espectros de HR-ESI-MS en modo negativo del compuesto **2**.

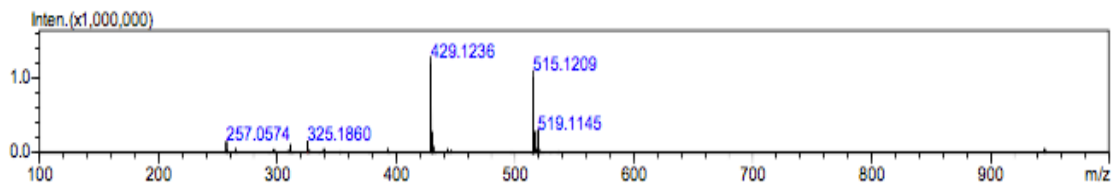
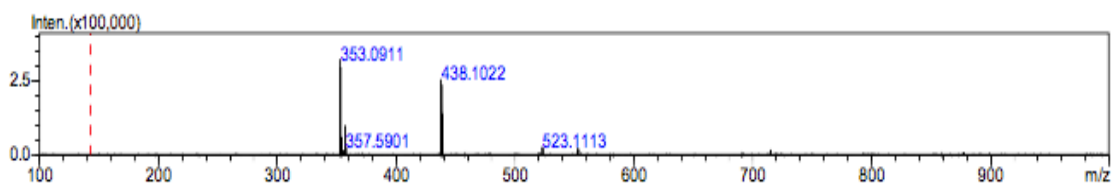
ESI[-]**ESI [-] MS/MS ion precursor 515.1212**

Figura 24. Espectros de HR-ESI-MS en modo negativo del compuesto **3**.

El espectro de RMN ^1H de **2** mostró la presencia de señales dobles que oscilaban entre $\delta = 6.78$ y 7.57 ppm, correspondientes a los protones aromáticos de los residuos de cafeilo; esto también se observó para el compuesto **3** con pequeñas diferencias principalmente en los desplazamientos químicos (Fig. 25 y 26). Los espectros de RMN ^1H de **2** y **3** también mostraron las señales de protones del anillo quínico. Para **2**, la señal a $\delta = 4.4$ ppm (H-3) debió aparecer con multiplicidad ddd; sin embargo, las pequeñas constantes de acoplamiento solapadas dieron lugar a un multiplete estrecho con forma de dd ($J = 3.1$ y 4.0 Hz), resultados similares se obtuvieron con las señales a $\delta = 2.13$, 2.25 , 2.30 y 2.33 ppm, atribuibles a los protones de metileno (H-2b, H-6b, H-6a, H-2a), las cuales debieron ser ddd pero solo aparecieron como dd o m. Este comportamiento también se obtuvo para las señales de **3**. Otra diferencia significativa entre los compuestos **2** y **3**, fueron las señales para los protones H-4, con desplazamientos químicos $\delta = 5.15$ (1H, dd, $J = 9.5$, 3.1 Hz) y $\delta = 5.05$ (1H, dd, $J = 9.5$, 3.3 Hz), respectivamente.

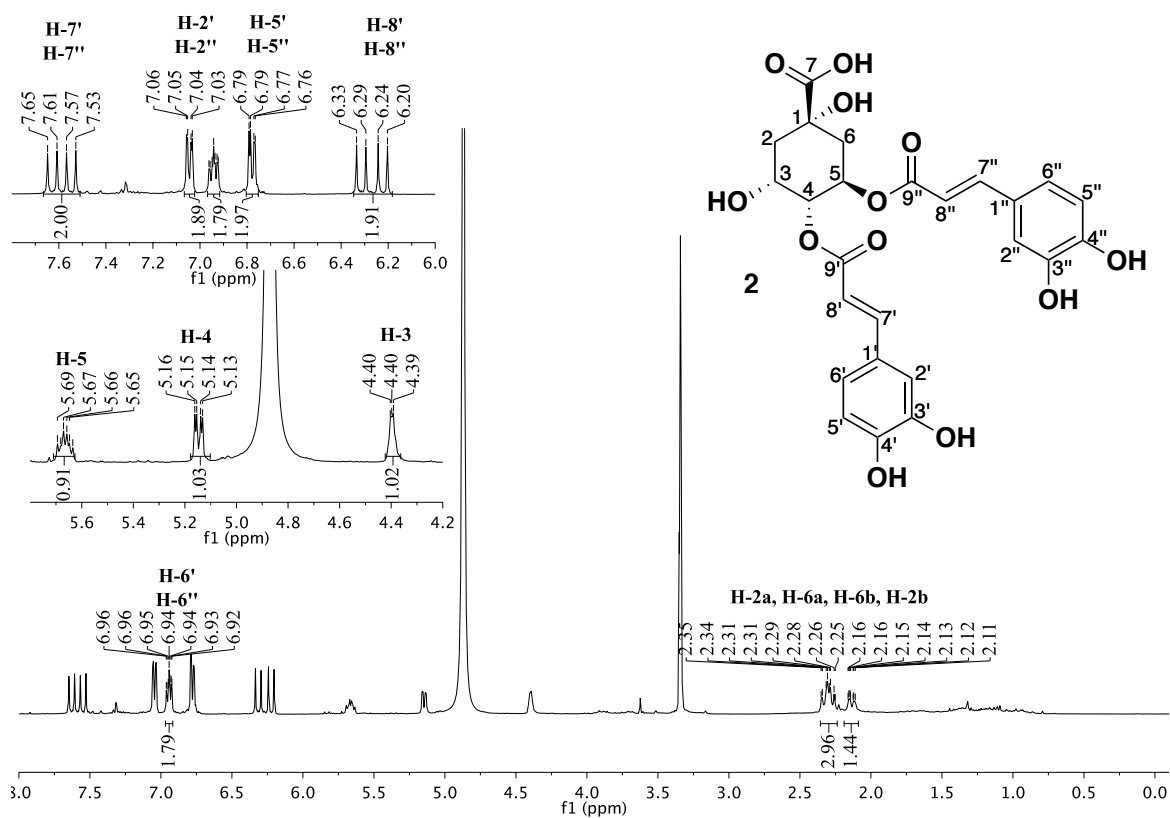


Figura 25. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2**, tomado en CD_3OD .

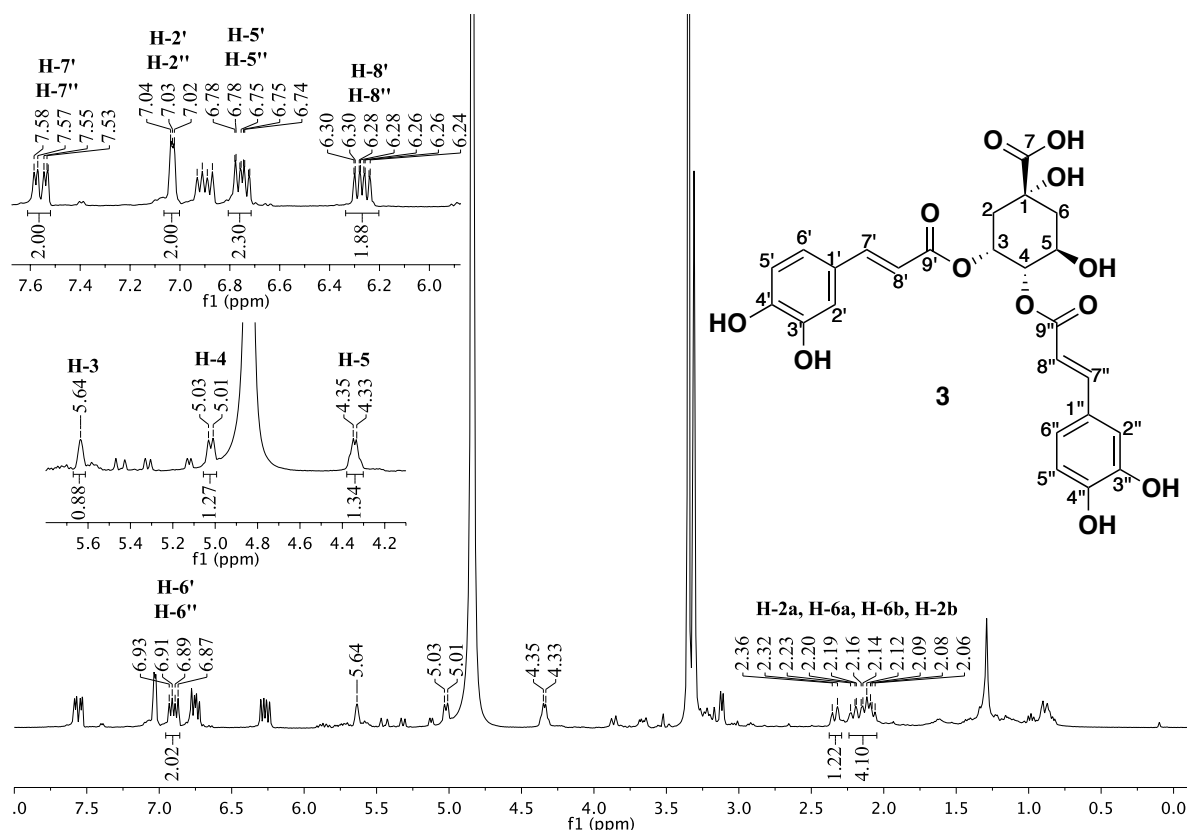


Figura 26. Espectro de RMN ^1H del compuesto **3**, tomado en CD_3OD .

Las constantes de acoplamiento calculadas con los resultados del experimento J -res, fueron claves para confirmar la posición axial y/o ecuatorial de los protones del anillo quínico. Luego, las posiciones de unión entre el anillo quínico y los cafeoilos fueron asignadas con las correlaciones obtenidas de los espectros HMBC. Así, el compuesto **2** mostró en el espectro de HMBC, correlaciones a larga distancia entre el protón H-5 con el carbono carbonílico C-9' $\delta = 168.6$ ppm y entre el protón H-4 $\delta = 5.15$ con C-9' $\delta = 168.25$ ppm, demostrando la unión 4,5-. En cambio, para el isómero **3**, el espectro de HMBC mostró, correlación entre H-4 $\delta = 5.05$ con C-9'' $\delta = 168.99$ y entre H-3 $\delta = 5.66$ con C-9' $\delta = 168.98$ ppm, confirmando la unión 3,4- (Anexos- Fig. 6). Esta asignación fue igualmente corroborada con el experimento COSY. Pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos fueron también evidenciadas en los espectros de RMN ^{13}C para estos dos compuestos (Tabla 4). La figura 27 muestra el espectro de RMN ^{13}C de **2**. Este trabajo constituye el primer reporte de los fenoles **2** y **3** en *T. diversifolia*.

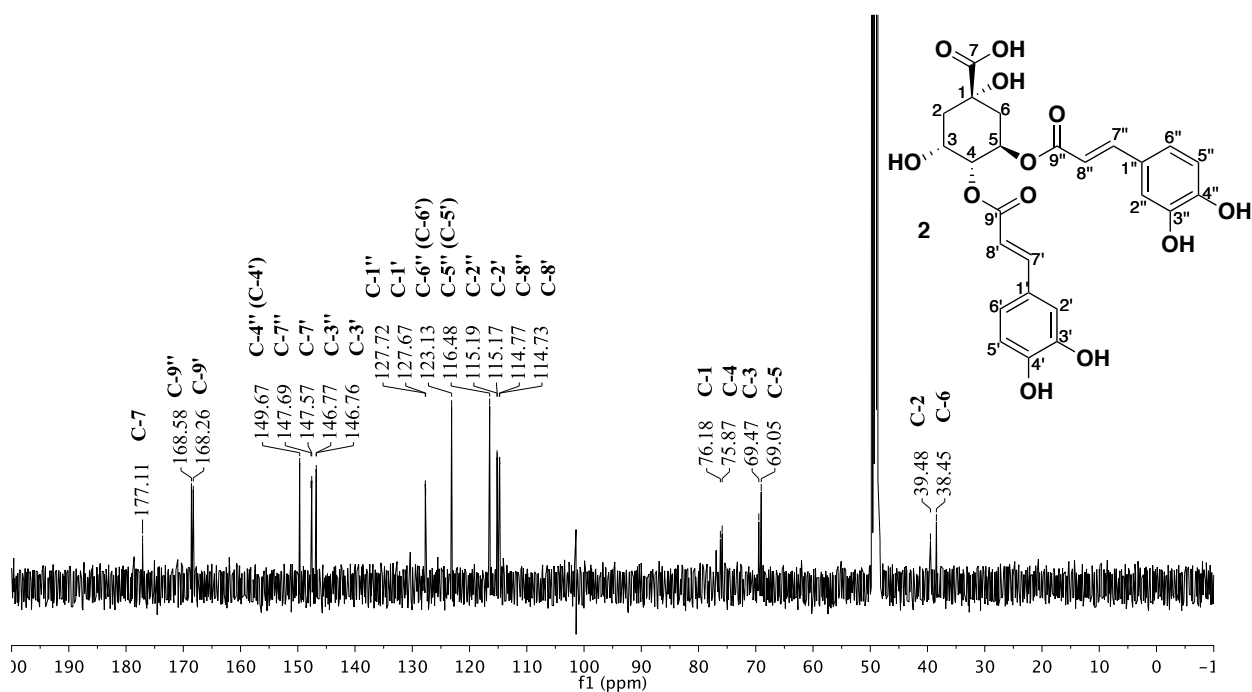


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **2**, tomado en CD_3OD .

Los compuestos **5**, **6** y **7** también se obtuvieron en forma de polvos de color amarillo pálido. Los espectros de HR-ESI-MS en modo de ionización negativa para **5** y **7**, mostraron iones $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 353.0869 y m/z 353.0867 respectivamente, sugiriendo una fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$, correspondiente a un peso molecular de 354 Da. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado para isómeros de un ácido quínico esterificado con una sola unidad de cafeoil⁸⁸. Los datos espectroscópicos de RMN ^1H (Fig. 28) y RMN ^{13}C condujeron a la identificación de **5**, **6** y **7** como ácidos 3-, 4-, 5-*O*-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA) respectivamente. Por otro lado, los análisis por HPLC-DAD de **5**, **6** y **7**, mostraron tiempos de retención de 4.58, 7.75 y 8.99 min respectivamente (condiciones cromatográficas en Sección 1.4.5.3.2) (Fig. 29), indicando el siguiente orden de elución: 1º) isómero **5**, 2º) isómero **6** y 3º) isómero **7**; estos resultados concuerdan con el orden reportado en la literatura^{87, 90-91}.

Los compuestos **5**, **6** y **7** también se obtuvieron en forma de polvos de color amarillo pálido.

Tabla 4. Datos de RMN ^1H (J en Hz) y RMN ^{13}C de compuestos aislados a partir de hojas de *T. diversifolia* (400 MHz, δ ppm, en CD_3OD).

2			3		
Cn	^{13}C	^1H	Cn	^{13}C	^1H
Quínico			Quínico		
1	76.2	-	1	77.4	-
2a	39.5	2.33, dd (14.1, 3.1)	2a	36.8	2.34, dd (15.0, 3.8)
2b		2.13, dd (14.1, 4.0)	2b		2.15, m
3	69.5	4.40, dd (4.0, 3.1)	3	70.1	5.66, dd (5.7, 3.3)
4	75.9	5.15, dd (9.5, 3.1)	4	76.22	5.05, dd (9.5, 3.3)
5	69.0	5.66, ddd (9.7, 9.5, 5.1)	5	65.8	4.36, ftd (9.5, 4.3)
6a	38.4	2.30, m	6a	41.3	2.22, m
6b		2.25, dd (13.3, 9.7)	6b		2.11, dd (13.7, 9.5)
7	177.1	-	7	179.0	-
Posición 4			Posición 3		
1'	127.7	-	1'	127.7	-
2'	115.16	7.05, dd (1.4, 0.4)	2'	115.2	7.02, dd (1.4, 0.4)
3'	146.8	-	3'	146.17	-
4'	149.6	-	4'	149.0	-
5'	116.5	6.78, d (8.4)	5'	116.73	6.74, d (8.3)
6'	123.1	6.94, dd (8.4, 1.4)	6'	123.6	6.89, dd (8.3, 1.4)
7'	147.6	7.62, d (16.0)	7'	147.5	7.55, d (15.9)
8'	114.7	6.31, d (16.0)	8'	115.4	6.27, d (15.9)
9'	168.25	-	9'	168.98	-
Posición 5			Posición 4		
1"	127.7	-	1"	127.59	-
2"	115.19	7.05, dd (1.1, 0.28)	2"	115.1	7.05, dd (1.5, 0.5)
3"	146.8	-	3"	146.2	-
4"	149.6	-	4"	149.0	-
5"	116.5	6.78, d (8.4)	5"	116.66	6.78, d (8.3)
6"	123.1	6.94, dd (8.4, 1.1)	6"	123.4	6.93, dd (8.3, 1.5)
7"	147.7	7.55, d (16.1)	7"	147.5	7.57, d (15.9)
8"	114.8	6.22, d (16.1)	8"	115.4	6.29, d (15.9)
9"	168.6	-	9"	168.99	-

Los espectros de HR-ESI-MS en modo de ionización negativa para **5** y **7**, mostraron iones $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 353.0869 y m/z 353.0867 respectivamente, sugiriendo una fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$, correspondiente a un peso molecular de 354 Da. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado para isómeros de un ácido quínico esterificado con una sola unidad de cafeoil⁸⁸. Los datos espectroscópicos de RMN ^1H (Fig. 28) y RMN ^{13}C condujeron a la

identificación de **5**, **6** y **7** como ácidos 3-, 4-, 5-*O*-cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA y 5-CQA) respectivamente. Por otro lado, los análisis por HPLC-DAD de **5**, **6** y **7**, mostraron tiempos de retención de 4.58, 7.75 y 8.99 min respectivamente (condiciones cromatográficas en Sección 1.4.5.3.2) (Fig. 29), indicando el siguiente orden de elución: 1º) isómero **5**, 2º) isómero **6** y 3º) isómero **7**; estos resultados concuerdan con el orden reportado en la literatura^{87, 90-91}.

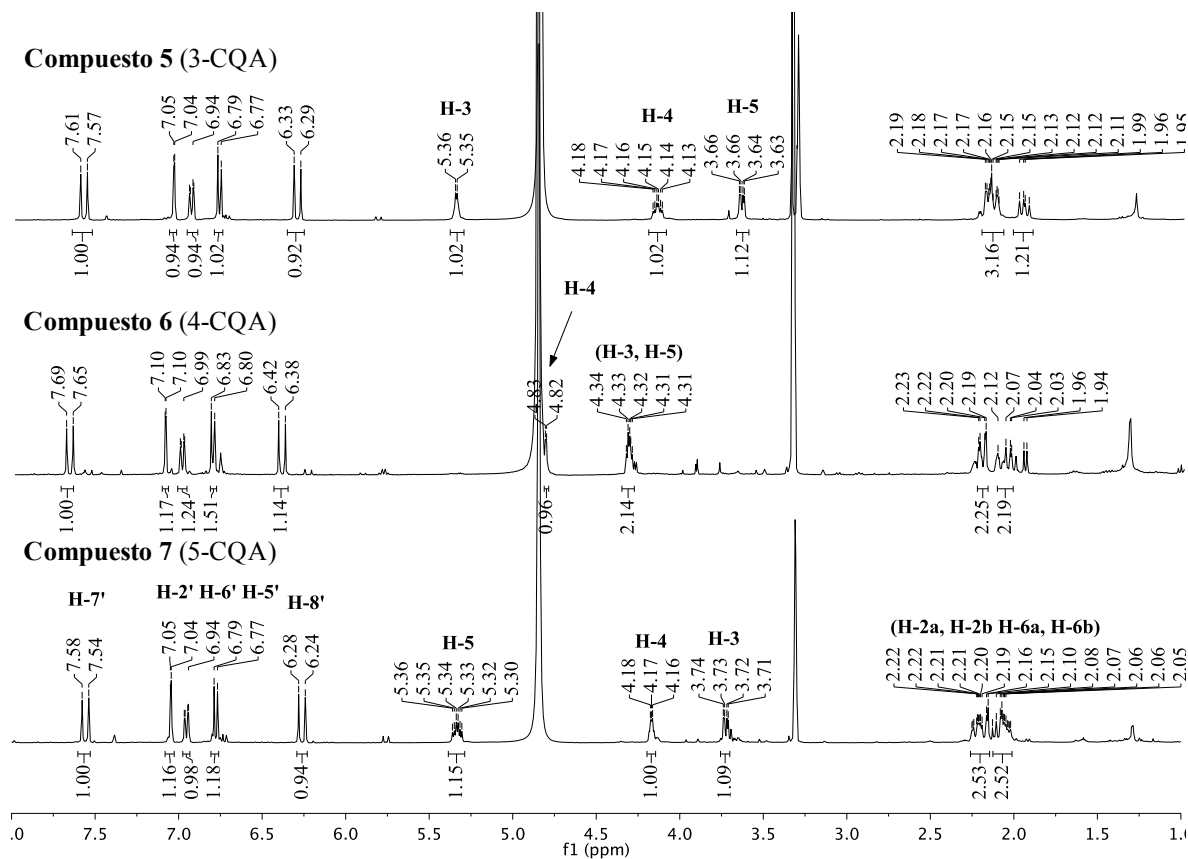


Figura 28. Comparación de espectros de RMN ¹H de los compuestos **5**, **6** y **7**, tomados en CD₃OD.

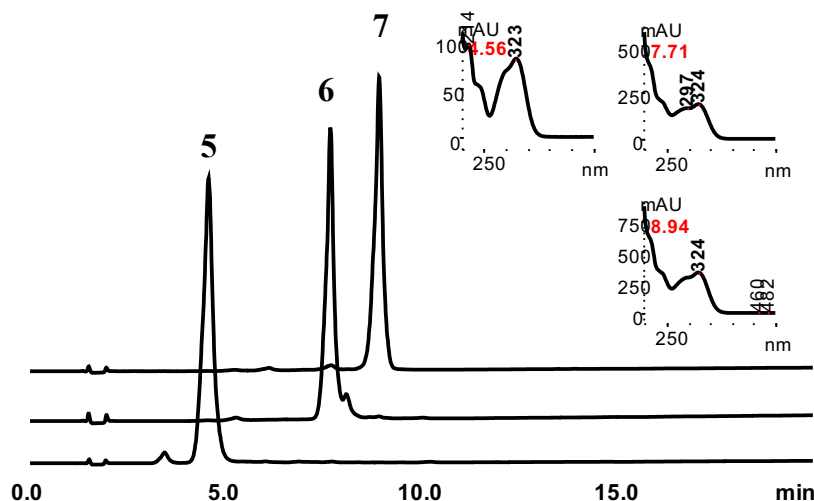


Figura 29. Cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD de los compuestos **5**, **6** y **7** de *T. diversifolia*.

1.3.2.2 Capacidad antioxidante de fracciones y compuestos aislados

La actividad antioxidante de los extractos, fracciones y compuestos aislados se determinó usando el ensayo de DPPH y se expresa como la concentración de la muestra necesaria para captar el 50% de los radicales libres de DPPH (FRS₅₀) (Tabla 5). Los resultados mostraron que el valor de DPPH FRS₅₀ del extracto de acetona al 70% (Td 2) disminuye con el fraccionamiento. Este aumento de la actividad antioxidante también fue evidente con un mayor CTF. Las fracciones Td 2.3.3.2, Td 2.3.3.5 y Td 2.3.3.15 mostraron actividad similar de eliminación de radicales libres; sin embargo, solamente las fracciones Td 2.3.3.5 y Td 2.3.3.15, que contienen dicafeoilos, mostraron un CTF cercano. De igual forma, las fracciones Td 2.3.1.2 y Td 2.3.1.3 que contienen los mono-cafeoilos, presentaron valores de FRS₅₀ similares.

Tabla 5. Actividad antioxidante^{a)} de fracciones y compuestos a partir de hojas de *Tithonia diversifolia*.

	DPPH		TPC (mg GA/ g DE) ^{c)}	FRAP (μM FeSO ₄ .7H ₂ O/μM) ^{d)}
	FRS ₅₀ (mg/L) ^{b)}	FRS ₅₀ (μM) ^{b)}		
Td 2	217.2±8.70		14.6±0.64	NT ^{e)}
Td 2.2	23±3.6		45.7±3.32	NT ^{e)}
Td 2.3	31±0.94		132.8±3.4	NT ^{e)}
Td 2.4	145.4±8.07		140.6±5.59	NT ^{e)}
Td 2.3.1	42.9±2.02		208.7±5.74	NT ^{e)}
Td 2.3.3	42±0.19		176.3±5.3	NT ^{e)}
Td 2.3.1.2	19.3±2.56		169.4±4.53	NT ^{e)}
Td 2.3.1.3	19.7±0.72		90.7±1.16	NT ^{e)}
Td 2.3.3.2	23.4±4.91		280.5±8.8	NT ^{e)}
Td 2.3.3.5	22.2±2.12		189.7±2.08	NT ^{e)}
Td 2.3.3.15	24.8±1.16		221.7±3.75	NT ^{e)}
1	12.9±0.12	43.8±0.42	-	1.5±0.13
2	10.2±0.52	19.8±0.99	-	3.4±0.53
3	12.3±0.36	23.8±0.69	-	1.8±0.15
4	37.1±1.16	71.8±2.24	-	1.3±0.10
5	12.9±1.14	36.5±3.22		1.03±0.14
6	36.1±1.43	101.8±4.03		0.38±0.017
7	13.3±0.13	37.5±0.37		1.14±0.086
Quercetina	4±0.56	13.4±1.8	-	6.4±0.11

^{a)}Los datos están expresados como el valor promedio ± S.D. ^{b)}Concentración de muestra necesaria para reducir el 50% de los radicales DPPHs. ^{c)}Estimación del contenido total de fenoles usando el método de Folin-Ciocalteu. ^{d)}Micromoles de Sulfato de hierro (III) heptahidratado por micromol de muestra. ^{e)}No ensayados.

Comparando las actividades obtenidas de los compuestos aislados con el control positivo, quercetina (13.4 ± 1.8 μM), los ácidos dicafeoilquínicos (diCQA) **2** y **3** mostraron actividades moderadas, mientras que los compuestos **1**, **4**, **5** y **7** fueron débilmente activos, sugiriendo

que la actividad es favorecida por dos grupos dicafeoil, y que las posiciones 4,5- y 3,4- en un ácido quínico, son más propensas a actuar como donantes de hidrógeno o electrones que la posición 3,5-, mejorando la actividad de eliminación de radicales. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios, donde también se ha evaluado la actividad antioxidante de estos compuestos⁹²⁻⁹³. Al comparar los resultados de FRS₅₀ entre los isómeros **5**, **6** y **7**, se encontró que **5** y **7**, poseen similar capacidad captora de radicales libres DPPH (36.5 ± 3.22 y 37.5 ± 0.37 μ M respectivamente), por el contrario, el compuesto **6** presentó la menor actividad, indicando que la sustitución 4-*O*- es menos eficaz que la 3- y 5-*O*- en CQAs. Estos resultados también fueron consistentes con estudios previos⁹⁴, en donde, la capacidad de eliminación de radicales DPPH de estos isómeros disminuye así: 3-*O*-> 5-*O*-> 4-*O*-. En general, todos los derivados CQA mostraron notables efectos de captura de radicales libres, las capacidades de estos compuestos aumentaron en el orden de **mono-CQA** [3-*O*-< 5-*O*-< 4-*O*-] < **di-CQA** [3,5-di-*O*-< 3,4-di-*O*-< 4,5-di-*O*-]. Estos resultados confirman, que el número de grupos cafeoilos en un ácido quínico para derivados de CQA, juega un papel importante en la actividad de eliminación o captura de radicales libres.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el ensayo FRAP para los compuestos **1**, **3**, **4**, **5** y **7** mostraron un poder antioxidante bajo, mientras para el compuesto **2** un poder antioxidante moderado. Las diferencias entre los resultados obtenidos por estos dos métodos posiblemente se debieron a sus diferentes mecanismos de reacción y mediciones⁹⁵. El valor obtenido para el compuesto **2** fue 3.4 ± 0.53 μ M FeSO₄.7H₂O/ μ M, lo que indica que la posición sustituida 4,5- (eq, eq) favorece la reducción de Fe⁺³ a Fe⁺² en comparación con las posiciones 3,4- (ax, eq) y 3,5- (ax, eq) en diCQA. La posible explicación de las diferencias en los resultados del FRAP podría ser que, en las posiciones 3,4- y 3,5-, no se forman enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos de las dicafeoilos antiparalelos; mientras que el compuesto **2** (4,5-sustituido y en paralelo) si se forman esos enlaces, de acuerdo a cálculos de MM2 (mecánica molecular -energy minimization with hindered rotation). Además, la formación de un sistema apilado, similar a una organización espacial de ferroceno por interacción π entre dos anillos aromáticos cercanos, produce una mejor transferencia electrónica con el metal. De otro lado, el compuesto **6** (4-*O*-CQA) mostró la más baja actividad reductora en comparación a los isómeros **5** y **7**⁸¹.

1.4 SECCIÓN EXPERIMENTAL

1.4.1 Instrumentación general

Los disolventes que se usaron en los procesos de extracción y en las diferentes cromatografías de columna, CCD y cromatografía analítica fueron grado HPLC. Los estándares, disolventes deuterados y reactivos necesarios para los ensayos, fueron adquiridos a casas de suministro de reactivos como Merck y Sigma-Aldrich. En los bioensayos: preparación y cambio de dieta se utilizó una cámara de flujo laminar Class II Biohazard safety cabinet- ESCO. Las separaciones por cromatografía en columna se realizaron sobre SiGel 60 (63-230 Mesh) Merck, Diaion HP20 y MCI-Gel WHP20 (Mitsubishi Chem) y en columnas de vidrio. La cromatografía en capa fina TLC se realizó sobre placas de Silica gel 60 F254 (Merck) y RP-18 F254 (Merck). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica se realizó en un equipo Shimadzu Corp. LC-2010 (Kyoto, Japón), equipado con un controlador de sistema CBM-20A, un degasificador DGU-20A, una bomba LC-20AD, un horno de columna CTO-20AC, un automuestreador SIL-20AHT y detector de arreglo de diodos PDA SPD-M20A. Para HPLC analítico se usó una columna Restek Pinnacle DB C18 de 5 μm (250 x 4.6 mm), y para HPLC semipreparativo se utilizó una columna Pinnacle II C18 de 5 μm (250 x 21.2 mm).

Las rotaciones ópticas de los compuestos puros se midieron con un polarímetro digital serie JASCO modelo P-2000. Los espectros UV-visibles se tomaron usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13 (RMN ^1H y ^{13}C) (1D y 2D), se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance III 400 a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los espectros de HPLC-MS de baja resolución fueron tomados en un sistema Waters ACQUITY UPLC H-Class acoplado a un SQ Detector 2, columna ACQUITY UPLC BEH C-18 (2.1x150 mm, 1.7 μm), elución con formiato de amonio: MeCN (5:5) 10 mM. Los espectros de ESI-MS en modo positivo y negativo, se registraron en un equipo Shimadzu LCMS-2010 y los espectros HR-MS fueron obtenidos en un equipo Shimadzu LCMS-IT-TOF (Ion Trap-Time Of Flight), por inserción directa con ácido fórmico 1%.

1.4.2 Material vegetal

Las plantas de *T. diversifolia* fueron cultivadas en la Universidad del Valle, sede Tuluá, Colombia. La especie fue identificada por S. Díaz-P., del Herbario Nacional Colombiano en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (material depositado No. COL 552686). Las hojas de *T. diversifolia* fueron recolectadas y secadas durante 10 días a temperatura ambiente (25°C), el porcentaje de humedad removido fue de 70.4%.

1.4.3 Obtención de extractos de hojas de *Tithonia diversifolia*

Las hojas secas y molidas de *T. diversifolia* (1144 g) fueron secuencialmente extraídas por ultrasonido con *n*-hexano (3 veces \times 15 min) seguido por acetona:agua 7:3 (3 veces \times 15 min). Los disolventes de ambas soluciones fueron removidos bajo presión reducida para obtener los respectivos extractos, hexanico Td 1 (19.13 g, R = 1.7%) y polar Td 2 (140.10 g, R = 12.3%). El extracto Td 2 fue suspendido en 1 L de agua y secuencialmente separado mediante extracción líquido-líquido con diclorometano y acetato de etilo, con lo anterior se obtuvieron los extractos de diclorometano Td 2.1 (10.6 g, R = 7.6%), acetato de etilo Td 2.2 (2.05 g, R = 1.5%) y el marco acuoso (82.31 g, R = 58.8%). Solo una parte del marco acuoso (50.0 g) fue separada con extracción líquido-líquido usando *n*-butanol saturado con agua para obtener los extractos de *n*-BuOH Td 2.3 (5.3 g, R = 10.5%) y residuo acuoso Td 2.4 (42.6 g, R = 85.1%). Los disolventes de Td 2.1, Td 2.2, Td 2.3 y Td 2.4 también fueron removidos bajo presión reducida.

1.4.4 Evaluación de la actividad insecticida de extractos de hojas de *Tithonia diversifolia* sobre hormigas cortadoras de hojas de *Atta cephalotes*

1.4.4.1 Fraccionamiento de extracto de diclorometano de *Tithonia diversifolia*

El extracto de diclorometano Td 2.1 (7.7 g) fue re-disuelto en *n*-hexano: acetato de etilo 7:3 y se fraccionó mediante CC y se obtuvieron seis fracciones nombradas como Td 2.1.1-2.1.6 (R = 92.4 %). Las fracciones recogidas fueron concentradas a presión reducida.

1.4.4.1.1 Condiciones cromatográficas

El extracto Td 2.1 se sometió a cromatografía de columna en una columna de vidrio (60 cm x 7 cm d.i.) con Silica gel 60 (70-230 mesh) (Sigma-Aldrich) como fase estacionaria y mezclas de disolventes con polaridad creciente *n*-hexano: acetato de etilo (7:3), *n*-hexano: acetona (8:2), *n*-hexano: acetona (1:1), acetona 100% y metanol 100%, como fase móvil. Las fracciones resultantes fueron monitoreadas mediante CCD utilizando cromatofolios de aluminio con soporte de Silica gel 60 F254 (Merck) y leídas con lámpara UV multiband 254/366 nm.

1.4.4.2 Colonias de *A. cephalotes*

Las colonias fueron establecidas en el laboratorio de la Estación Experimental del Departamento de Biología de la Universidad del Valle, Cali, Colombia, en 991 msnm, a 24°C de temperatura media y 75% de humedad relativa, siguiendo los protocolos descritos por Valderrama et al. (2006). En los diferentes bioensayos se usaron obreras seleccionadas de tamaño medio (2.6-3.7 mm ancho de cápsula cefálica).

1.4.4.3 Bioensayos

La actividad insecticida de los extractos de *T. diversifolia* sobre obreras de *A. cephalotes* fue evaluada mediante bioensayos de ingestión y contacto de acuerdo a la metodología propuesta por Castaño-Quintana¹⁰. En el primer caso, el extracto fue incorporado a una dieta artificial mientras que para el segundo fue aplicado directamente en el mesosoma de las obreras con ayuda de un pincel. En el bioensayo de ingestión, se suministró una dieta artificial a las obreras, a base de glucosa y agua (Anexos- Tabla 5)⁹⁶. La concentración respectiva de la sustancia a evaluar fue añadida después de la esterilización y enfriado del agar dieta. La dieta se suministró, en forma de cubos, cada dos días en cajas Petri. En el bioensayo de contacto, se suministró solamente la dieta artificial a las hormigas y la sustancia a evaluar se aplicó con un pincel estéril a cada obrera en el mesosoma una vez al inicio del experimento. El conteo de hormigas muertas en los dos bioensayos se hizo diariamente. Esta metodología también fue usada para evaluar la toxicidad de dimetilsulfóxido (DMSO) y

carboximetilcelulosa (CMC), compuestos escogidos para disolver los diferentes extractos. En el caso de los bioensayos de ingestión y contacto con extractos se usaron como blanco CMC 0.166 y 0.125%, respectivamente. La concentración al final de los extractos en cada tratamiento fue de 1000 ppm. También se comparó por ingestión la efectividad del extracto de diclorometano a 500 y 250 ppm. En todos los bioensayos se usó agua como control.

1.4.4.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Se establecieron cinco experimentos de medidas repetidas. Los experimentos con DMSO y CMC y con extractos de *T. diversifolia* a 1000 ppm, recibieron seis tratamientos diferentes y de forma independiente (Anexos- Tabla 6). Las hormigas fueron seleccionadas de cinco colonias de laboratorio y divididas al azar, en grupos de 10 obreras por cada caja Petri. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento en cada experimento. La variable respuesta fue el número de hormigas muertas por día durante 14 días. El experimento en el cual se evaluó la concentración del extracto de diclorometano (Td 2.1) por ingestión recibió cuatro tratamientos y la variable respuesta se contó durante los 10 primeros días.

El análisis estadístico de los datos de actividad insecticida mediante contacto e ingestión fue desarrollado por el programa R versión 3.1.2 (<http://www.R-project.org>). Los modelos lineales mixtos generalizados fueron empleados para determinar el efecto que tiene, a través del tiempo, los diferentes extractos, los blancos (CMC y DMSO) y el control sobre la mortalidad de hormigas, en los bioensayos de ingestión y contacto. La prueba de contrastes múltiples por pares, basada en intervalos de confianza, utilizando la razón de oportunidades (Odds ratio - OR)⁹⁷ fue llevada a cabo cuando se encontró un efecto significativo de los extractos y/o sustancias en el modelo. Esta prueba evaluó el extracto que es más probable que cause mortalidad en hormigas. Todos los análisis fueron realizados empleando un nivel de significancia del 95%.

1.4.4.5 Evaluación de la actividad inhibitoria sobre colinesterasa de extractos y fracciones de *Tithonia diversifolia*

Los extractos y fracciones de *T. diversifolia* fueron sometidos a un ensayo de actividad biológica como inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), con el fin de obtener una perspectiva sobre inhibiciones selectivas contra ambas enzimas. Las actividades inhibitorias fueron evaluadas por el método de Ellman y col.⁹⁸. En microplacas de 96 pozos, se disolvió la muestra (50 μ L) en un buffer de fosfato (K_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2.3 mM, NaCl 150 mM, y 0.5% de Tween 20, pH 7.6). En este mismo buffer fue añadido una solución de AChE/BuChE (50 μ L, 0.25 unidad/mL) de *Electrophorus electricus* y suero equino (Sigma-Aldrich), respectivamente. Las soluciones de ensayo, excepto la del sustrato, fueron preincubadas con la enzima durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se añadió la solución de sustrato compuesta por Na_2HPO_4 (40 mM), acetiltiocolina/butiriltiocolina (0.24 mM) y 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (0.2 mM, DTNB, reactivo de Ellman). La absorbancia de la reacción a 405 nm durante cinco minutos se midió en un lector de placas de microtitulación (Multiskan EX, Thermo, Vantaa, Finlandia). La inhibición de AChE/BuChE se determinó para cada extracto y fracción. Se calculó la actividad enzimática como porcentaje, comparando con el control compuesto por buffer y solución de enzima. Los extractos se ensayaron en un intervalo de dilución de 500 a 15 μ g /mL. Cada ensayo se realizó por triplicado y cada reacción se repitió tres veces. Los valores de IC_{50} fueron calculados realizando un análisis de regresión. El alcaloide galantamina fue usado como compuesto de referencia. El valor de IC_{50} de galantamina fue desarrollado en tres platos en un rango de 250 a 0.122 μ g/mL, en el primer plato el valor fue 0.179 μ g/mL (0.486 μ M) en el segundo 0.213 μ g/mL (0.578 μ M) y en el tercero fue 0.193 μ g/mL (0.524 μ M), los cuales dan un valor promedio de 0.532 μ M.

1.4.5 Aislamiento de derivados de ácidos cafeico a partir de extractos polares de hojas de *Tithonia diversifolia* con actividad antioxidante

1.4.5.1 Fraccionamiento y aislamiento

El extracto butanólico Td 2.3 (5.3 g) se sometió a cromatografía de columna sobre DIAION HP-20 para obtener cuatro fracciones Td 2.3.1-2.3.4 (72% de recuperación). Las fracciones

más activas y obtenidas con mayor masa Td 2.3.1 (1.22 g) y Td 2.3.3 (2.15 g) fueron sometidas a cromatografía de columna sobre MCI-Gel CHP20P. La fracción Td 2.3.1 se dividió en dos partes, tomando 500 mg para cada cromatografía. Por su parte, la fracción Td 2.3.3 se dividió en 4 partes de 500 mg. De la fracción Td 2.3.1 se obtuvieron 14 fracciones con un porcentaje de recuperación de 56.1%, y para la fracción Td 2.3.3, se obtuvieron 15 fracciones con un porcentaje de recuperación del 82.4%.

Las fracciones Td 2.3.1.1, Td 2.3.3.2, Td 2.3.3.5 y Td 2.3.3.15 fueron purificadas mediante HPLC semipreparativo para obtener los diferentes compuestos puros. Los compuestos **1** (4.3 mg), **2** (11.1 mg), **3** (5.6 mg) se obtuvieron a partir de las fracciones Td 2.3.3.2, Td 2.3.3.15 y Td 2.3.3.5 respectivamente, por el contrario, **4** (2.5 mg) fue obtenido directamente de la fracción Td 2.3.1.10 sin purificación por HPLC. Los compuestos **5** (9.9 mg), **6** (1.5 mg), **7** (6.2 mg) se obtuvieron a partir de la mezcla de las fracciones Td 2.3.1.2 y Td 2.3.1.3.

1.4.5.2 Caracterización de derivados de ácido cafeico (Anexos)

1.4.5.3 Condiciones cromatográficas

1.4.5.3.1 Cromatografía de columna

Para el fraccionamiento del extracto Td 2.3, se utilizó DIAION HP-20 (Mitsubishi Chemical) como fase estacionaria, empacada en una columna de vidrio (30 cm x 5 cm d.i.) y utilizando como fase móvil, un gradiente de agua: MeOH (10-100% en MeOH incrementándolo en un 10% en cada paso). Las fracciones Td 2.3.1 y Td 2.3.3 (500 mg) fue separada utilizando una columna de vidrio (50 cm x 2.5 cm d.i.) empacada con MCI-gel CHP20P (Sigma-Aldrich) como fase estacionaria, se utilizó un gradiente de agua: MeOH (30-100% en MeOH incrementándolo en un 5% en cada paso).

1.4.5.3.2 Cromatografía líquida

Para el análisis por HPLC se empleó un sistema Prominence UFLC Shimadzu, equipado con detector de arreglo de diodos (DAD). Las corridas analíticas se desarrollaron en una columna Restek Pinnacle DB C18 5µm (250 x 4.6 mm) con el horno operando a 40 °C, la fase móvil

consistió de una solución de $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{ac})}$ al 0.05% como solvente A, e isopropanol (IPA) como solvente B, se aplicó un gradiente como sigue: 2% de B durante 2 min, luego 2-25% de B durante 15 min, 25% de B durante 10 min, 25-2% de B durante 5 min, 2% de B durante 10 min. En algunos casos el gradiente fue cambiado como sigue: 2% de B durante 1 min, luego 2-25% de B durante 25 min, 25% de B durante 5 min, 25-2% de B durante 3 min, 2% de B durante 7 min, para mejorar la separación de los isómeros. El tiempo total de duración de los métodos fue de 40 min. Para las corridas analíticas en gradiente se usó un flujo de 0.6 mL/min. Las separaciones semipreparativas para la obtención de los compuestos **1-4**, se realizaron de forma isocrática utilizando una columna Restek Pinnacle II C18 5 μm (250 x 21.2 mm), y una mezcla de $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{ac})}$ 0.05%-IPA en varias proporciones dependiendo de la fracción. Para **1**, **2**, **3** se usó $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{aq})}$ 0.05%-IPA en proporciones 93:7, 87:13, 91:9, respectivamente. Por el contrario, los compuestos **5-7**, fueron obtenidos de forma gradiente utilizando la misma columna, con fase móvil solución de $\text{H}_3\text{PO}_{4(\text{ac})}$ al 0.05% como solvente A, y acetonitrilo como solvente B: 6% de B durante 1 min, luego 6-7% de B durante 100 min, 7% de B durante 3 min, 7-6% de B durante 5 min, 6% de B durante 3 min.

Para el análisis por LC-MS de alta resolución de los compuestos aislados, se utilizó una columna Shimadzu Premier C18 3 μm (150 x 4.6 mm), la fase móvil consistió en acetonitrilo 6% en solución de ácido fórmico al 1% en agua como solvente A y acetonitrilo 90% en solución de ácido fórmico al 1% como solvente B, se aplicó un gradiente como sigue: 0-50% de B durante 25 min, 50% de B durante 2 min, 50-0% de B durante 2 min, 0% de B durante 6 min a un flujo de 0.5 mL / min.

1.4.5.4 Estimación del contenido total de fenoles

El CTF fue medido usando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu y siguiendo la metodología de Sdiri y col.⁹⁹, este método fue ajustado a un formato de microplacas de 96 pozos. Las muestras (extracto, fracción o estándar) fue preparado a 1024 mg/L en 2-propanol o metanol. La muestra (100 μL), se añadió a una microplaca de 96 pozos, posteriormente se realizó diluciones seriadas (512-15.63 mg/L), luego se mezcló con 50 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (20% v/v) y 50 μL de solución de carbonato de sodio (1.6% p/v). La placa

fue calentada a 60 °C durante 1h, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 min y finalmente, se midió la absorbancia a 650 nm en un lector de microplacas Metertech AccuReader M965+. Las muestras fueron medidas por cuadruplicado. Se usó ácido gálico (AG) como estándar en una curva de calibración, donde el rango óptimo fue de 32 a 1.0 mg/L. Los resultados fueron expresados como mg de AG/100 mg de extracto seco (ES).

1.4.5.5 Evaluación de la actividad antioxidante de extractos, fracciones y compuestos aislados

1.4.5.5.1 Estimación de la capacidad captora de radicales DPPH

La capacidad captora de radicales libres de DPPH se determinó usando un formato previamente descrito por Sdiriy col.⁹⁹ con ligeras modificaciones. Las muestras (extracto, fracción, controles o compuestos puros) se prepararon a 1024 mg/L disueltas en IPA o metanol. La muestra (100 µL) fue añadida a una microplaca de 96 pozos, posteriormente se realizaron diluciones seriadas de las muestras (512-0.5 mg/L) y fueron mezcladas con 100 µL de solución de DPPH (132 mg/L) en metanol. Después de 1 h de reacción a temperatura ambiente y en oscuridad, se midió el cambio en la absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas (Meterthech, AccuReader M965+). El IPA y/o metanol fueron usados como control negativo, la quercetina (Sigma-Aldrich) se utilizó como control positivo. Los experimentos con quercetina se realizaron en paralelo. Todas las muestras se midieron por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de capacidad captadora de radicales libres que reduzca en un 50% al radical DPPH (FRS) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%FRS = \left[\frac{Ab - Am}{Ab} \right] \times 100$$

Donde *Ab* es la absorbancia normalizada del DPPH sin muestra o control positivo y *Am* es la absorbancia normalizada del DPPH con muestra o control positivo. La concentración efectiva de la muestra y control que reduce el 50% del radical DPPH (FRS) se calculó y expresó en mg/L (ppm).

1.4.5.5.2 Determinación del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP)

El poder reductor de Fe^{+3} a Fe^{+2} por un antioxidante fue determinado usando el método de Benzie and Strain¹⁰⁰, y ajustado para su uso en una microplaca de 96 pozos. Las muestras (extracto, fracción, control positivo, compuestos estándar o puros) se prepararon a 1024 mg/L en IPA, metanol o agua. El reactivo FRAP se preparó mezclando tampón acetato (300 mM, pH 3.6), TPTZ 10 mM (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) en metanol acidificado 40 mM y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM a una relación 10: 1: 1 (v/v/v) en este orden. A continuación, la mezcla se calentó durante 1h a 37°C y después se dejó reposar a temperatura ambiente. Inmediatamente, se mezclaron dos diluciones en serie (1-512 mg/L) de la muestra (30 μL) con 140 μL de reactivo FRAP y 30 μL de agua en la microplaca. Finalmente, la absorbancia se midió a 600 nm en un lector de microplacas (Metertech, AccuReader M 965+) después de una hora de reacción. De nuevo, la quercetina se utilizó como control positivo y se examinó en experimentos paralelos. Todas las muestras se midieron por triplicado. Se realizó una curva de calibración estándar de sulfato de hierro (II) heptahidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Todos los resultados se expresan en mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 g)⁻¹ de extracto seco.

CAPITULO 2. SÍNTESIS TOTAL Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE REGIOISOMEROS ANÁLOGOS DE ACHYROFURANO

2.1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento y la producción de antibióticos es uno de los mayores logros de la medicina. El uso de agentes antimicrobianos ha reducido la morbilidad y mortalidad en la población, contribuyendo indirectamente en el incremento de la esperanza de vida¹⁰¹. No obstante, los microorganismos patógenos han reaccionado a diversos fármacos, adaptándose a nuevos entornos mediante el desarrollo de resistencia a antibióticos usando una amplia variedad de mecanismos¹⁰²⁻¹⁰³. La resistencia antimicrobiana es un fenómeno que aparece de forma natural por modificaciones genéticas, sin embargo, esta se ve facilitada por el uso incontrolado e inadecuado de los antibióticos¹¹. Por ejemplo, las prescripciones erróneas y la deficiencia en la prevención y control de infecciones, son otros factores que favorecen la propagación de la farmacoresistencia¹⁰⁴. Según la OMS, la resistencia bacteriana es una de las mayores amenazas en el mundo. Infecciones comunes como neumonía, tuberculosis, septicemia, gonorrea y otras producidas por bacterias Gram-negativas, podrían provocar complicaciones graves y consecuencias devastadoras para la salud pública al hacerse cada vez más difíciles y en ocasiones imposible de tratar¹².

A lo largo de los años, numerosos estudios han demostrado que el aumento en el consumo de antibióticos contribuye a la aparición de resistencia en diversos géneros bacterianos¹⁰⁵⁻¹⁰⁶. Un patógeno humano, con gran capacidad para adquirir resistencia, *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram-positiva, que causa una amplia gama de infecciones clínicas, entre ellas bacteriemia y endocarditis infecciosa, así como también infecciones osteoarticulares, cutáneas y de tejidos blandos, pleuropulmonares y de aparatos¹⁰⁷.

La efectividad de la penicilina introducida a principio de 1940 fue prácticamente anulada en una década, debido a epidemias plasmídicas que propagaron el gen β -lactamasa a través de toda la especie de *S. aureus*. En 1961, se informó por primera vez la existencia de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), poco después de utilizar este antibiótico para tratar *S. aureus* resistentes a penicilina. Cerca de 1980, los clones epidémicos de MRSA

adquirieron rasgos resistentes a múltiples fármacos y se extendieron por todo el mundo para convertirse en uno de los agentes causales más importantes de las infecciones adquiridas en hospitales¹⁰⁸, por lo tanto, el tratamiento para controlar la propagación de las infecciones se ha convertido en un desafío. La vancomicina ha sido utilizada comúnmente como antibiótico para el tratamiento de varias MRSA, pero, en el año 2000, se identificaron nuevas cepas MRSA con disminución de la susceptibilidad a vancomicina (vancomicina intermedia resistente a *S. aureus* [VISA]) y más recientemente con resistencia a vancomicina de alto nivel (*S. aureus* resistente a vancomicina [VRSA]). Se conoce que VRSA portan el trasposon Tn1546, adquirido de *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina, alterando la estructura y el metabolismo de la pared celular, pero los mecanismos de resistencia en los aislados VISA aún no están bien definidos¹⁰⁹. Otros antimicrobianos producidos en la actualidad, como glicopéptidos y betalactámicos, han demostrado ser cada vez menos eficaces en la eliminación de las cepas más virulentas de MRSA^{108, 110-111} y VISA¹⁰¹. Por consiguiente, las empresas farmacéuticas han impulsado el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.

Los productos naturales proporcionan una variedad de estructuras novedosas farmacológicamente activas que pueden ser una alternativa en la búsqueda de nuevos medicamentos antimicrobianos¹¹². Áreas terapéuticas que trabajan en enfermedades infecciosas y oncología, se han beneficiado de la abundante diversidad de productos naturales, capaces de interactuar con muchos objetivos específicos dentro de la célula. Durante muchos años, los productos naturales han sido la base para la mayoría de los medicamentos aprobados por la FDA¹¹³; haciendo posible la obtención de derivados semisintéticos y sintéticos, que en ocasiones son más eficaces y menos tóxicos.

Los extractos de diclorometano de las partes aéreas de la planta *Achyrocline satureoides* han revelado una notable actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas. Estos resultados se deben a la presencia de achyrofurano **9** (Fig. 30), un dibenzofurano polioxigenado prenilado, que mostró actividad antibacteriana contra una serie de bacterias clínicamente relevantes, incluyendo MRSA y VISA (Tabla 6). Este compuesto presenta acción bactericida en rango nanomolar (120-250 nM) a las 2h de haberse añadido al cultivo

y elimina por completo toda la población después de 12h¹¹⁴⁻¹¹⁵. De igual forma, existen otros dibenzofuranos naturales, como **10**, **11** y **12** que han presentado actividad antibacteriana (Fig. 30)¹³⁻¹⁴, pero ninguno de los valores reportados es comparable a los obtenidos por achyrofurano (Tabla 6). Por lo tanto, se infiere que los patrones de sustitución simétrica, así como, efectos electrónicos y estéricos parecen jugar un papel importante para la actividad antimicrobiana. Hasta el momento, no se han realizado estudios detallados que muestren la relación estructura-actividad de dibenzofuranos con actividad antimicrobiana. Por tal motivo, es importante la obtención de análogos de achyrofurano por medio de fuentes naturales o también de forma sintética con un diseño racional, para determinar los requisitos estructurales que potencializan la actividad antimicrobiana.

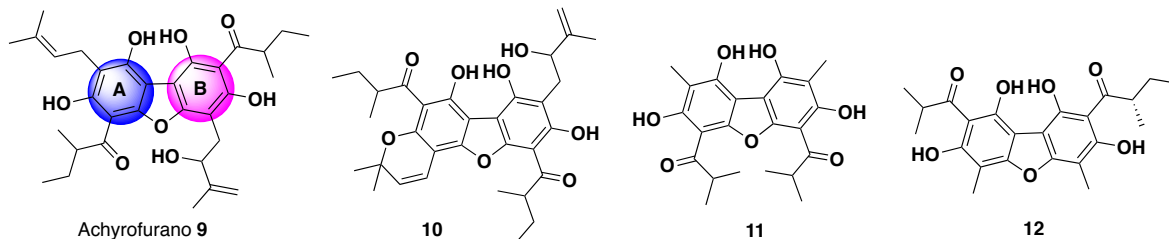


Figura 30. Dibenzofuranos polioxigenados con actividad antibacteriana.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de dibenzofuranos naturales contra diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.

Compuesto	<i>Staphylococcus aureus</i> MIC (μM)		
	NRS402	ATCC25923	ATCC29213
9^{a)}	0.12	0.25	--
10^{a)}	32	32	--
11^{b)}	--	13.2	26.5
12^{b)}	--	0.5	3.9

^{a)}Compuestos aislados de *Achyrocline satureoides*; ^{b)}Compuestos aislados de *Pilidiostigma glabrum*.

2.2 ANTECEDENTES GENERALES

2.2.1 Generalidades de *Achyrocline satureioides*

Achyrocline satureioides (LAM.) DC, Marcela, es una planta perenne perteneciente a la familia de las Asteraceae, tribu *Inulae*; sinonimia: *Gnaphalium satureioides* Lam., *Achyrocline vargasiana* DC., *A. Satureioides* (Lam.) DC var. *citrina* Lorentz. Es nativa del sureste de América del Sur y es común encontrarla en Brasil, Uruguay y Argentina. Esta planta posee propiedades aromáticas y es ampliamente utilizada en medicina tradicional por sus propiedades biológicas¹¹⁶.

2.2.1.1 Etnobotánica *Achyrocline satureioides*

Algunos de los reportes que se encuentran de los usos tradicionales de *A. satureioides*, demuestran que las partes aéreas e inflorescencias de esta planta son usados en forma de té, debido a sus efectos digestivos, anti-inflamatorios, antiespasmódicos, antidiabéticos y anti-asmáticos y repelentes¹¹⁷⁻¹²⁴. Además, Lorenzi and Matos¹²⁵, encontraron que esta planta sirve contra trastornos intestinales, cólicos, diarrea e irregularidades menstruales. Este uso popular ha motivado estudios biológicos y etno-farmacológicos de la especie y han revelado una amplia gama de propiedades farmacológicas.

2.2.1.2 Fitoquímica de *Achyrocline satureioides*

Las investigaciones sobre la composición química de *A. satureioides* revelan la presencia de metabolitos secundarios en las partes aéreas e inflorescencias que pertenecen a varios grupos fitoquímicos¹¹⁶. En extractos hidro-alcohólicos, se han reportado como principales constituyentes a flavonoides como quercetina, luteolina y 3-*O*-metilquercetina (Fig. 31), los cuales son conocidos por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorios, antiespasmódicos, analgésicos, sedantes, antivirales e inmunomoduladores¹²⁶⁻¹³⁰. Pero también, se han destacado por mostrar propiedad anticancerígena, la cual fue observada debido a la inhibición de la proliferación celular, la detención del ciclo celular, la apoptosis, la inhibición del angiogénesis y la prevención de la metástasis, y sumado a los resultados

exitosos en estudios preclínicos, sugieren que estos flavonoides junto a achyrobichalcona (Fig. 31) aislados de *A. satureioides* son biomoléculas prometedoras para el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer en el futuro¹³¹.

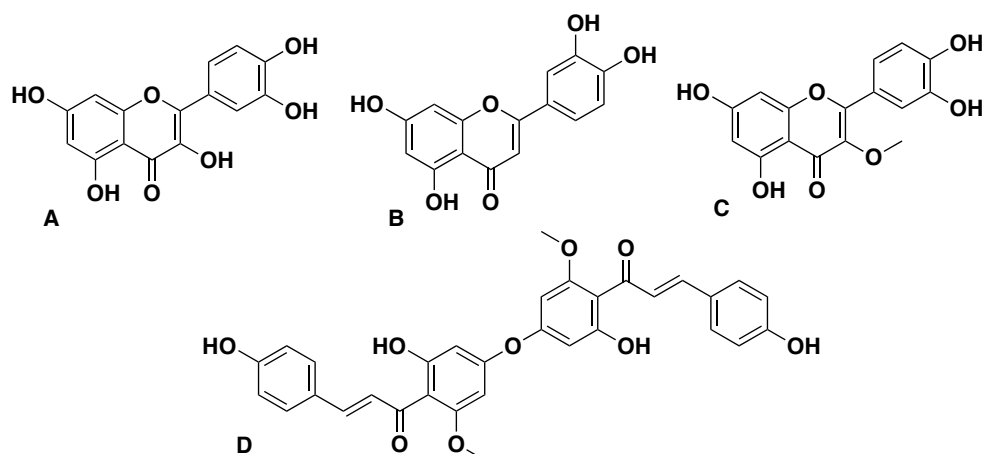


Figura 31. Estructura química de (A) quercetina, (B) luteolina, (C) 3-*O*-metilquercetina y (D) achyrobichalcona encontrados en *A. satureioides*.

Otros fenoles encontrados en Marcela son: ácido cafeico, quercetin-3-metil éter, galangin, quercetagetina, tamarixetina, ácidos 3-,4-,5-*O*-cafeoilquínicos, ácidos 3,4-, 3,5- 4,5-*O*-cafeoilquínicos, escoparol y ésteres de callerianin (3,4-dihidroxibencil alcohol-4-glucósido) con ácido cafeico y ácido protocatéquico¹¹⁶. Otros metabolitos secundarios también identificados son cumarinas, polisacaridos, poliacetilenidas y glicolípidos¹³²⁻¹³⁴.

De otro lado, Carney y col.¹³⁵, aislaron por primera vez un dibenzofurano prenilado y oxigenado en el extracto etanólico de las partes aéreas de *A. satureioides*, llamado achyrofurano **9** (Fig. 30), esto fue realizado por fraccionamiento dirigido por bioensayo utilizando el modelo de ratón db/db para la diabetes tipo 2. En este estudio, achyrofurano bajó significativamente los niveles de glucosa en sangre, cuando se administró oralmente 20 mg/kg q.d., mostrando como el anillo dibenzofurano es relevante en su actividad. Un estudio de docking *in silico* mostró una alta afinidad en el acoplamiento con el sitio AMP (adenosín monofosfato) de la FBPasa (fructosa bifosfatasa) justificando su actividad antihiperglicémica¹³⁶.

Por otra parte, extractos crudos de *A. saturoioides* han mostrado notables actividades antimicrobianas *in vitro*. En la búsqueda de principios activos que confieren esta actividad, se trabajó el extracto de diclorometano de las partes aéreas de esta planta. De este extracto también se aisló el achyrofurano **9**, el cual mostró interesante actividad antibacteriana contra un conjunto de cepas Gram-positivas clínicamente relevantes: *Staphylococcus aureus* ATC25923 sensible a la meticilina (MSSA); *Staphylococcus aureus* NRS402, resistente a la meticilina (MRSA) y también, intermedio resistente a la vancomicina (VISA); y *Enterococcus faecalis* ATCC29212. El achyrofurano tuvo una MIC (minimum inhibitory concentration por sus siglas en inglés) de 0.12 μ M para VISA y MRSA, 0.25 μ M para MSSA, y 3.96 μ M para *E. faecalis*. En este ensayo también usaron como controles ampicilina y kanamicina, los resultados concluyentes fueron que el achyrofurano era tan bueno como la ampicilina contra MSSA y *E. faecalis*, y era mucho mejor que la kanamicina contra estas dos bacterias. Además, achyrofurano **9** presenta acción bactericida en rango nanomolar (120-250 nM) a las dos horas de haberse añadido al cultivo y elimina por completo toda la población después de 12 horas¹¹⁴. Otro compuesto aislado del extracto etanólico de *A. saturoioides* y relacionado con **9** es la 23-metil-6-*O*-desmetilauricepirona **13** (Fig. 32), este metabolito secundario se obtuvo a través del fraccionamiento guiado por actividad antibacteriana¹³⁷. El compuesto **13** es un derivado del floroglucinol, parte de las diferencias entre este compuesto y el achyrofurano **9** son: un grupo 4-hidroxipiran-2-ona y un fenol trihidroxilado, en lugar de dos fenoles dihidroxilados. El compuesto **13** tuvo un MIC de aproximadamente 6 μ g/mL, 100 veces mayor que el presentado para achyrofurano.

Recientemente Caseroy col.¹³, aislaron tres nuevos floroglucinoles prenilados α -pironas **14**, **15** y **16**, y un nuevo dibenzofurano **17** (Fig. 32), junto a los compuestos conocidos: **13** y **9**, a partir de los extractos de *n*-hexano y diclorometano de las partes aéreas de *A. saturoioides*. En este estudio se determinó la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios aislados, así como, de derivados sintéticos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los resultados permitieron la asignación de algunas relaciones estructura-actividad. Así, se reveló la importancia de la cadena de 3-metil-2-butenilo unida al núcleo de floroglucinol en la serie de floroglucinol α -pirona, y al comparar la actividad de los dos dibenzofuranos **9** y **17**, se concluyó que la presencia del anillo dihidropirano fusionado al núcleo de floroglucinol

y a su vez la presencia del grupo 2-hidroxi-3-metil-3-butenilo en lugar del grupo 3-metil-2-butenilo reduce drásticamente la actividad. Por otro lado, los metabolitos secundarios aislados no mostraron actividad contra *E. coli* y cepas de levaduras.

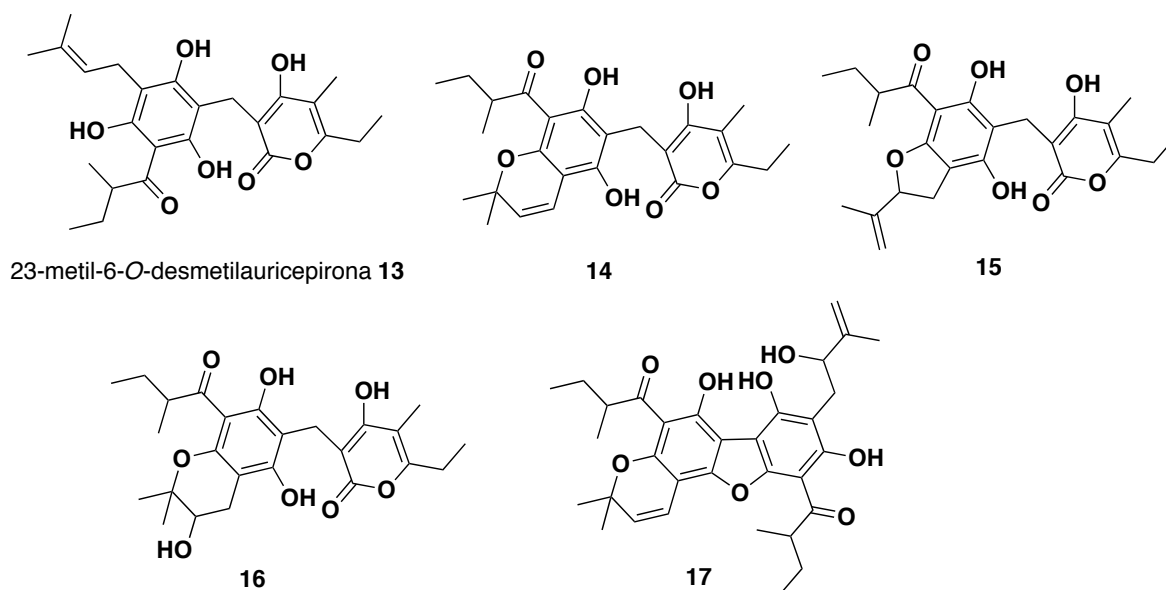


Figura 32. Estructura química de floroglucinoles prenilados α-pironas **13-16** y dibenzofurano **17** aislados de *A. satereioides*.

2.2.2 Generalidades de derivados de floroglucinol

Los derivados de floroglucinol son una clase importante de metabolitos secundarios presentes principalmente en la familia Myrtaceae, pero también, se han informado en otras familias como Guttiferae, Euphorbiaceae, Aspidiaceae, Compositae, Rutaceae, Rosaceae, Clusiaceae, Lauraceae, Crassulaceae, Cannabinaceae y Fagaceae⁵. Esta clase de compuestos abarca desde el 1,3,5-trihidroxibenceno hasta los complejos florotaninos con 31 restos de floroglucinol. El 1,3,5-trihidroxibenceno también ha sido aislado de fuentes naturales y es usado en medicina, cosméticos, pesticidas, pinturas y teñidos. De otro lado, los derivados de floroglucinol incluyen alrededor de 700 compuestos naturales con diversas actividades biológicas. Específicamente, los acilfloroglucinoles comprenden el grupo más grande de compuestos de floroglucinol de origen natural, y se han descrito más de 100 floroglucinoles acilados simples. Estos incluyen floroglucinoles o sus mono-, di- y tri-éteres acilados en

grados variables con cadenas lineales o ramificadas⁶. Los más comunes contienen restos de prenilo, geranilo, isovalerilo, metilbutirilo, isobutirilo, acetilo y benzoílo.

Existen reportes de acilfloroglucinoles con actividad antibacteriana. Por ejemplo, grandinol aislado a partir de las hojas de *Eucalyptus grandis*, exhibió esta actividad contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (5 y 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente)¹³⁸. Además, 2,4-diacetilfloroglucinol aislado de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, posee actividad antibacteriana a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ frente a los siguientes organismos: *Streptococcus pyogenes*, *S. faecalis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium welchii* y *Lactobacillus casei*¹³⁹⁻¹⁴⁰. Floroglucinoles con prenilo como caespitina y caespitato aislados de *H. caespititium* también han mostrado actividad antibacteriana¹⁴¹⁻¹⁴² (Fig. 33). No solo acilfloroglucinoles naturales han sido evaluados, también otros derivados sintéticos han mostrado ser activos frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*¹⁴³.

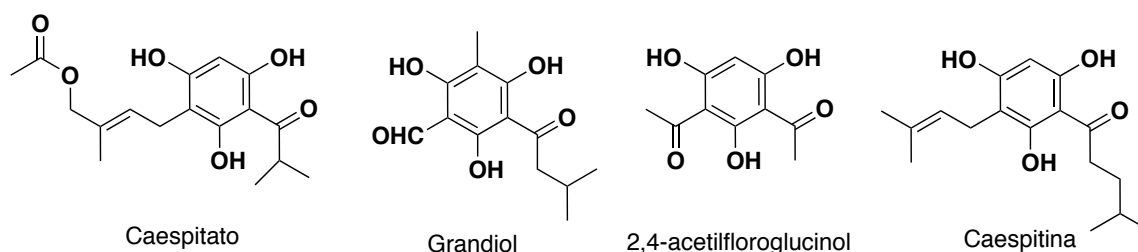
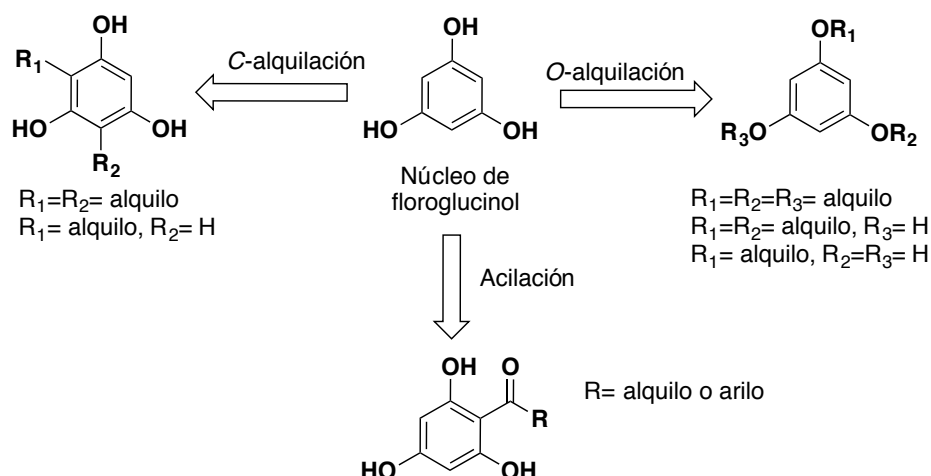


Figura 33. Acilfloroglucinoles con actividad antibacteriana.

Debido a la importancia química y biológica que tienen este tipo de compuestos, algunos estudios se han dedicado a sintetizarlos. La obtención de acilfloroglucinoles implica tres etapas: 1) Acilación usando cloruros de acilo, anhídridos, nitrilos de alquilo y ocasionalmente ácidos carboxílicos, 2) Mono-, di- o tri-*O*-alquilación de floroglucinol con diazometano, sulfato de dimetilo, yoduro de metilo, etc., y 3) mono- o di-*C*-alquilación con sulfato de dimetilo, yoduro o bromuro de alquilo o bromuro en presencia de un álcali (Esquema 1)⁶.



Esquema 1. Etapas para la síntesis de acilfloroglucinoles.

2.2.3 Generalidades de los dibenzofuranos

Los dibenzofuranos son compuestos aromáticos que contienen dos anillos bencénicos fusionados a un anillo central furano, los más representativos son los altamente oxigenados y pueden ser aislados hongos y plantas. A continuación, se muestra un resumen de reportes de actividades biológicas significativas por miembros de esta clase de compuestos.

2.2.3.1 Dibenzofuranos aislados de fuentes naturales con actividades biológicas

2.2.3.1.1 Dibenzofuranos anticancerígenos

A partir de dos variedades diferentes del hongo *Trichia favoginea*, fueron aislados dibenzofuranos con actividad anti-cáncer, los cuales se conocen como kehokorins AE. Kehokorin A, D y E mostraron actividad contra células HeLa, con valores de IC_{50} que van desde 1.5 $\mu\text{g/mL}$ y 6.1 $\mu\text{g/mL}$ para kehokorin A y E respectivamente¹⁴⁴⁻¹⁴⁵. Por otro lado, tres dibenzofuranos clorados estructuralmente similares Pf1, Pf2 y AB0022A, fueron aislados de dos especies de *Dictyostelium*¹⁴⁶. Además, Pf1 y AB0022A mostraron actividad frente a tres líneas celulares (K562, HeLa and 3T3-L1), sugiriendo que la presencia del grupo fenólico libre adyacente al carbonilo es esencial para la actividad. Otro representante de esta clase de compuestos, es el rhodomyrtoxin B, el cual ha sido aislado del extracto de la corteza de *Pilidiostigma tropicum* y de la cereza australiana *Rhodomyrtus macrocarpa*. Este

compuesto presenta actividad citotóxica contra células de carcinoma hepatocelular humano Hep-G2 y células adenocarcinoma mamario humanas MDA-MB-231 con LC_{50} de $19.0 (\pm 9.0)$ y $2.50 (\pm 0.27) \mu M$ respectivamente¹⁴⁷. Otros estudios han revelado la inhibición en el crecimiento de las células NCEB1 con un valor de IC_{50} de $9 \mu M$ ¹⁴⁸. Las estructuras químicas de estos dibenzofuranos son mostradas en la figura 34.

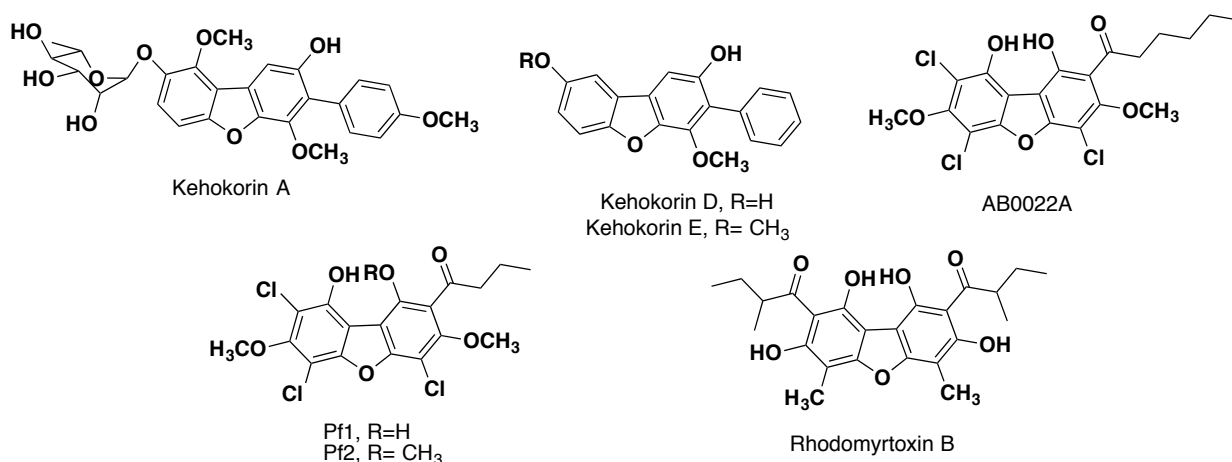


Figura 34. Estructuras químicas de dibenzofuranos con actividad anti-cáncer.

2.2.3.1.2 Dibenzofuranos antialérgicos

Los dibenzofuranos también pueden presentar actividades antialérgicas. Vialinins B y C (Fig. 35), fueron aislados del hongo comestible *Thelephora vialis*, los cuales contienen en su estructura ésteres de ácido fenilacético y ácido *p*-hidroxibenzoico. Se encontró que Vialinin B inhibe la liberación de TNF- α (tumor necrosis factor por sus siglas en inglés) en células RBL-2H3. Debido a que TNF- α está implicado en la inflamación, la inhibición de su liberación posiblemente sirva para la supresión de respuestas alérgicas. En un ensayo se comparó la respuesta de estos dibenzofuranos con el inmunosupresor FK-506, los IC_{50} encontrados para Vianilin B y C fueron 0.02 y 0.89 nM, mientras para el compuesto conocido fue de 0.25 nM¹⁴⁹.

2.2.3.1.3 Dibenzofuranos antioxidantes

Un análogo de vialinin B es el ganbajunin B (Fig. 35), el cual difiere solamente en la acilación de un fenol con el grupo fenilacetilo. Ganbajunin B ha sido aislado de varias especies del género *Thelephora*. Liu y col.¹⁵⁰ encontraron que este compuesto inhibe la peroxidación lipídica en el hígado de ratas con un IC₅₀ de 54 μ M más bajo en comparación a los valores obtenidos para los estándares vitamina E (α -tocoferol) y BHA (hidroxianisol butilado) de 295 y 222 μ M respectivamente. Además, se encontró que este compuesto tiene actividad captora de radicales superóxido y DPPH con EC₅₀ de 204 y 55 μ M respectivamente, estos valores fueron menores que los obtenidos con el control positivo BHA, los cuales fueron 424 y 110 μ M.

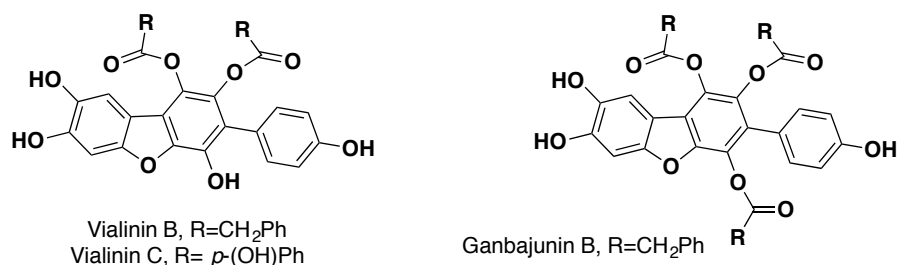


Figura 35. Estructura química de dibenzofuranos vialinins (B y C), y ganbajunin B.

2.2.3.1.4 Dibenzofuranos antibacterianos

Un dibenzofurano destacado por su potente actividad antibacteriana, es el ácido úsnico (Fig. 36), este compuesto se puede encontrar en muchos líquenes (por ejemplo, *Usnea* y *Cladonia*)¹⁵¹. El ácido úsnico presenta un anillo de furano central fusionado a un anillo de hidroxiciclohexa-2,4-dien-1-ona y un grupo dihidroxifenilo, con un patrón de sustitución similar al del anillo A en achyrofurano **9**¹¹⁴. Previos estudios antimicrobianos también han encontrado especificidad anti-Gram-positiva con valores de MIC equivalentes a los de la ampicilina, mostrando además que este compuesto es bacteriostático¹⁵², sin embargo, el achyrofurano **9** es bactericida en el rango nanomolar¹¹⁴. Estos trabajos muestran que la estructura del achyrofurano **9** versus ácido úsnico es relevante y debe ser tomada en cuenta para el desarrollo posterior de compuestos antimicrobianos.

En los hongos del género *Boleptosis* se han aislado varios dibenzofuranos llamados boleptosins. Hasta el momento se han reportado diferentes boleptosins, su estructura general se muestra en la figura 36. Estos compuestos difieren en el número de sustituyentes de oxígeno en el anillo aromático no fusionado y también en el tipo de sustitución: acetilado o metilado. Se encontró que el boleptosin 11 presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium smegmatis* con valores de IC₅₀ de 242, 424, 272 y 96 mg/mL respectivamente¹⁵³.

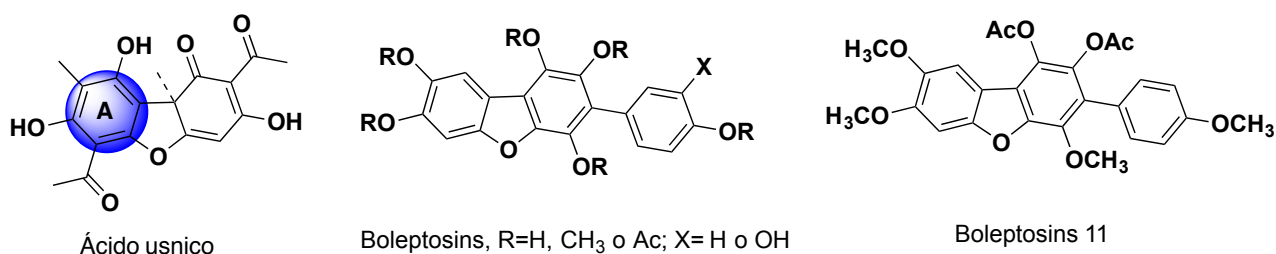


Figura 36. Estructura química de dibenzofuranos antibacterianos; ácido úsnico y Boleptosins.

De otro lado, rhodomyrtoxin B también posee actividad antibacteriana, este fue activo contra bacterias Gram-positivas *Bacillus cereus* (ATCC14579) y *Staphylococcus aureus* (ATCC29213), los valores de MIC encontrados fueron 0.14 y 0.28 μ M respectivamente¹⁴⁷. Así mismo, Shouy col.¹⁴ aislaron seis dibenzofuranos **18-23** estructuralmente similares a rhodomyrtoxin B de la hojas de *Pilidiostigma glabrum*, los cuales presentaron actividad antibacteriana contra Gram-positivas (Fig. 37). Los compuestos que poseen sustitución con el grupo acilo en posición 2 y 8 (ver Fig. 37) mostraron la mejor actividad contra *Staphylococcus aureus*, con valores de MIC en el rango de micromolar, por el contrario, los que tenían la sustitución en posición 4 y 6 fueron menos activos. La mayoría de estos compuestos mostraron actividad bactericida MCB (minimium bacterial concentration por sus siglas en inglés) $\leq 4 \times$ MIC en tres cepas diferentes.

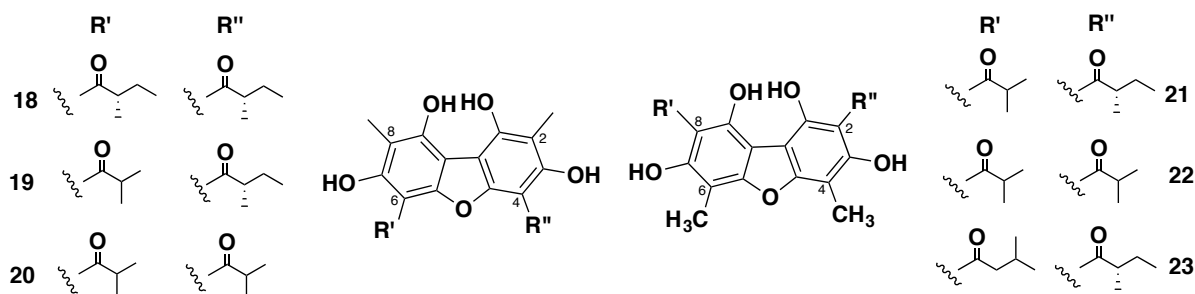


Figura 37. Dibenzofuranos aislados de *Pilidiostigma glabrum*.

2.2.3.2 Síntesis de dibenzofuranos

Debido a las diferentes actividades biológicas expuestas por los dibenzofuranos, algunos trabajos se han dedicado a la síntesis total de los productos naturales o de análogos.

Rhodomyrtoxin C es un compuesto de estructura similar a rhodomyrtoxin B. Sargent y col.¹⁵⁴ reportaron la síntesis total de Rhodomyrtoxin C, esta inicia con la obtención del compuesto iodado **24**, haciendo reaccionar 1,3,5-trimetoxibenceno con yodo en presencia de ácido yodhídrico. Posteriormente, un acoplamiento de Ullmann usando Cu(s), condujo a la formación del bifenilo **25**. Luego, al calentar **25** en ácido yodhídrico y al hacer metilación con yodometano obtuvieron el 1,3,7,9-tetrametoxibenzofurano **26** con 37% de rendimiento. Una formilación de Vilsmeier-Haack, seguida por la reducción con LiAlH₄ conduce la formación de **27**, el cual se convierte en **28** mediante una hidrogenación catalítica. Para realizar otra metilación en la posición 6 del dibenzofurano, se repite los pasos anteriores, obteniendo de esta forma el derivado dimetilado **29** con un 76% de rendimiento. Finalmente, realizaron dos acilaciones de Friedel-Crafts, en las que utilizan el cloruro de ácido y luego el ácido carboxílico de 2-metilbutirilo o isovalerilo como se muestra en la figura 38. La desprotección de los metoxilos se realizó con tribromuro de boro¹⁵⁵. La síntesis total para la obtención de rhodomyrtoxin C involucró 8 pasos de reacción con un rendimiento global del 5%.

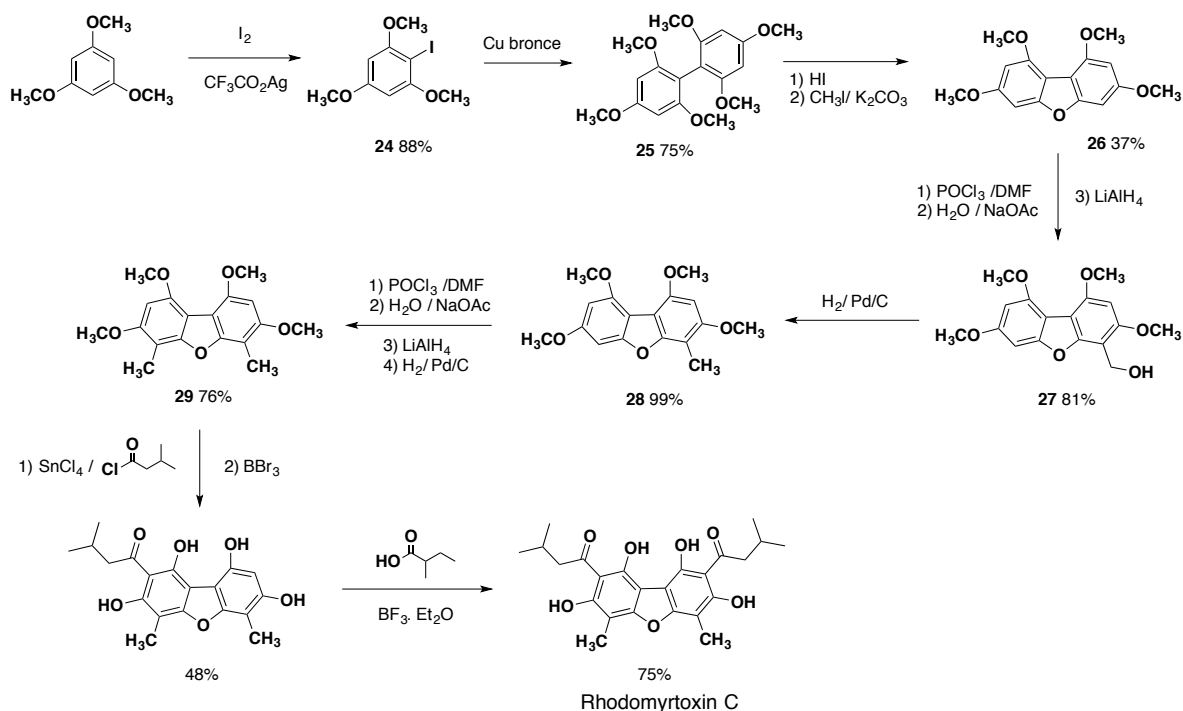


Figura 38. Síntesis total de rhodomyrtxin C.

La síntesis de Achyrofurano no ha sido realizada hasta el momento, sin embargo, Heng y col.¹⁵⁶ reportaron la síntesis de análogos de achyrofurano, donde se eliminó los grupos metilbutenol y metilbuteno, análogos: 1,10-(1,3,7,9-tetrahidroxidibenzofuran-2,6-diil) bis (3-metilbutan-1-ona) (**30**) y 1,10-(1,3,7,9-tetrahidroxidibenzofuran-2,6-diil) bis (2-metilbutan-1-ona) (**31**). Las reacciones implicadas hasta la formación del bifénilo **25** son similares a las usadas en la obtención de Rhodomyrtxin C, de nuevo el trimetoxibenceno es yodado, luego realizan un acoplamiento de Ullmann utilizando Cu sólido en lugar de Cu bronce. Los pasos de ciclación y desprotección se lograron con la mezcla 1:1 de HBr:AcOH y, por último, por medio de una acilación de Friedel-Crafts con AlCl_3 , se introdujo el sustituyente isovalerilo en lados opuestos. La obtención del compuesto **30** fue confirmada por los diferentes datos de desplazamiento químicos de RMN ^1H , obtenidos para los dos protones libres del dibenzofurano. Esta misma reacción fue usada para la síntesis del análogo de achyrofurano **31** sustituyendo el cloruro de isovalerilo por cloruro de 2-metilbutirilo (Fig. 39). Esta síntesis solo implicó 4 pasos de reacción, con rendimiento global de 9 y 8% para los análogos **30** y **31** respectivamente. En este trabajo no se realizó la determinación de la actividad antibacteriana de los productos.

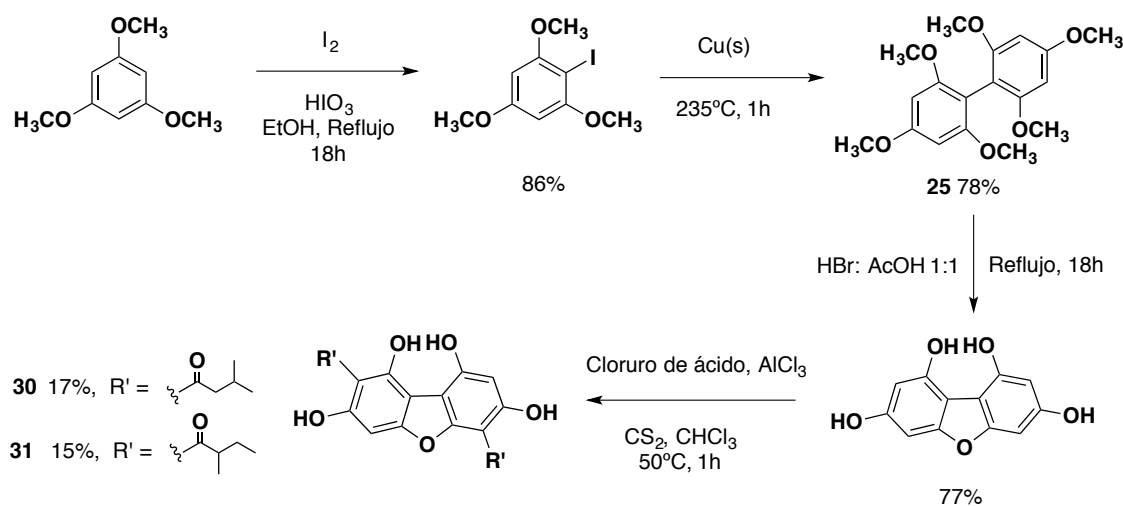


Figura 39. Síntesis total de análogos de achyrofurano **30** y **31**.

Wommacky col.¹⁵, reportaron la síntesis de un compuesto llamado preachyrofurano **32**. Partiendo del 1,3,5-trimetoxibenceno, se realizó primero una prenilación y posteriormente una formilación de Vilsmeier-Haack usando cloruro de oxalilo, que condujo a la formación del aldehído **33** con 94% de rendimiento. La reacción con diazoalquil catalizada por el triflato de escandio, produjo el compuesto acilado **34** con 91% de rendimiento. Después, se realizó la desmetilación de los tres grupos $-\text{OCH}_3$ con tribromuro de boro, este paso disminuyó drásticamente el rendimiento obteniéndose solo un 15%. Finalmente, la ciclación-dimerización oxidativa del fenol **35**, se realizó con cloruro de hierro (III) soportado sobre silica gel (Fig. 40), logrando el preachyrofurano y un dimero no ciclado con 51 y 21% de rendimiento respectivamente. La obtención de preachyrofurano se realizó en 5 pasos con un rendimiento global de 5%.

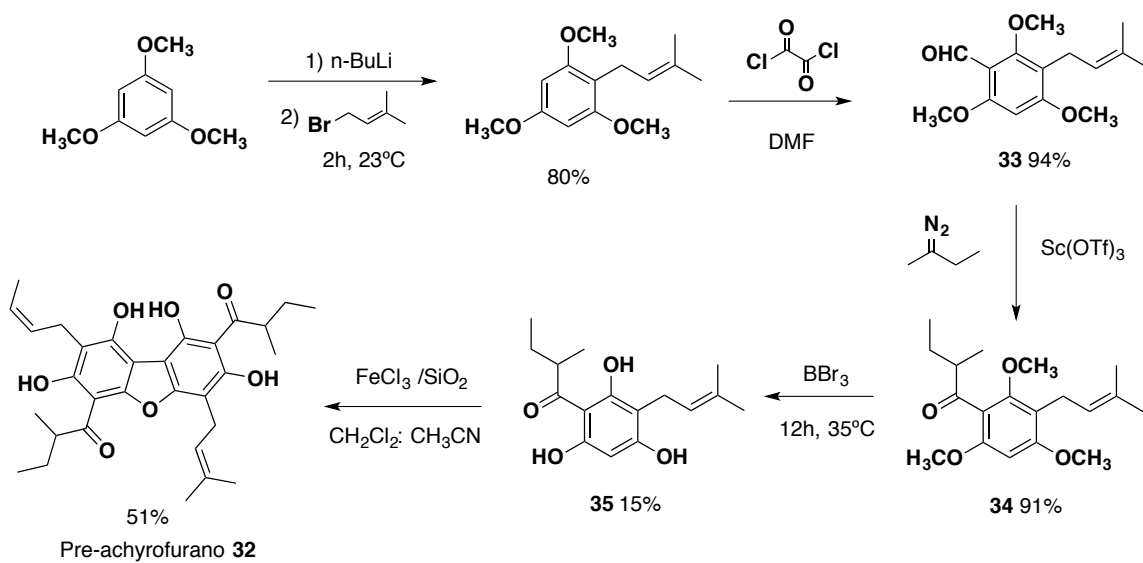


Figura 40. Síntesis total de preachyrofurano **32**.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

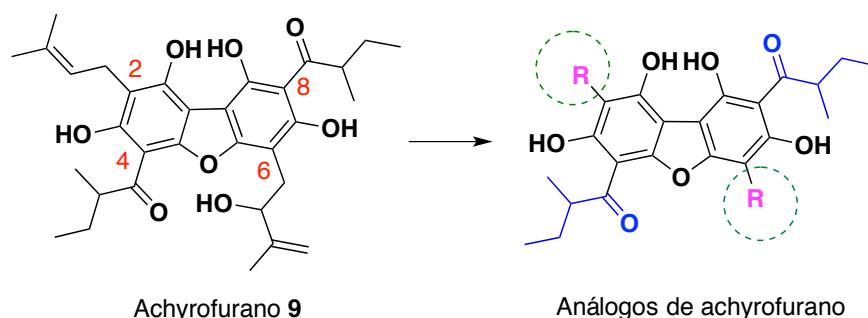
Se realizó la síntesis total de regioisómeros análogos de achyrofurano. Para ello, se planteó la síntesis de un derivado de floroglucinol yodado (1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-iodofenil]-2-metilbutan-1-ona) **36**, sintetizado a través de la acilación de Friedel-Crafts de floroglucinol bencilado seguida de yodación. Posteriormente, un acoplamiento de Suzuki-Miyaura con el compuesto yodado, dio lugar a derivados de acilfloroglucinol con altos rendimientos, los cuales bajo condiciones de desprotección de los grupos bencilos generaron acilfloroglucinoles. Finalmente, por medio de dimerización oxidativa biomimética se obtuvieron dibenzofuranos acil polioxigenados. Con esta ruta se sintetizaron en total trece compuestos nuevos racémicos: un derivado de floroglucinol yodado (**36**), siete derivados de acilfloroglucinol (**37a-g**), tres acilfloroglucinoles (**38a-b**, **46**), dos dibenzofuranos (**39a-b**). La caracterización estructural de los compuestos sintetizados se realizó mediante el análisis de datos espectrales (IR, HR-MS, RMN ^1H , RMN ^{13}C y RMN-2D). La actividad antibacteriana de los fenoles sustituidos y dibenzofuranos fue evaluada frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, logrando resultados interesantes, en algunos casos con valores de MIC menores a los obtenidos con achyrofurano.

2.3.1 Análisis retrosintético para la obtención de análogos estructurales de achyrofurano

Hasta la fecha, se han reportado varias aproximaciones sintéticas para la obtención de análogos del achyrofurano (Sección 2.2.3.2). Sin embargo, solo una aproximación implicó la obtención de un compuesto de estructura muy similar al achyrofurano llamado pre-achyrofurano **32**, en cinco pasos de reacción y con un rendimiento global de 5%; involucrando diazoalcanos inestables y bajos rendimientos en las etapas de desmetilación. Por lo tanto, se tuvieron en cuenta estas limitantes.

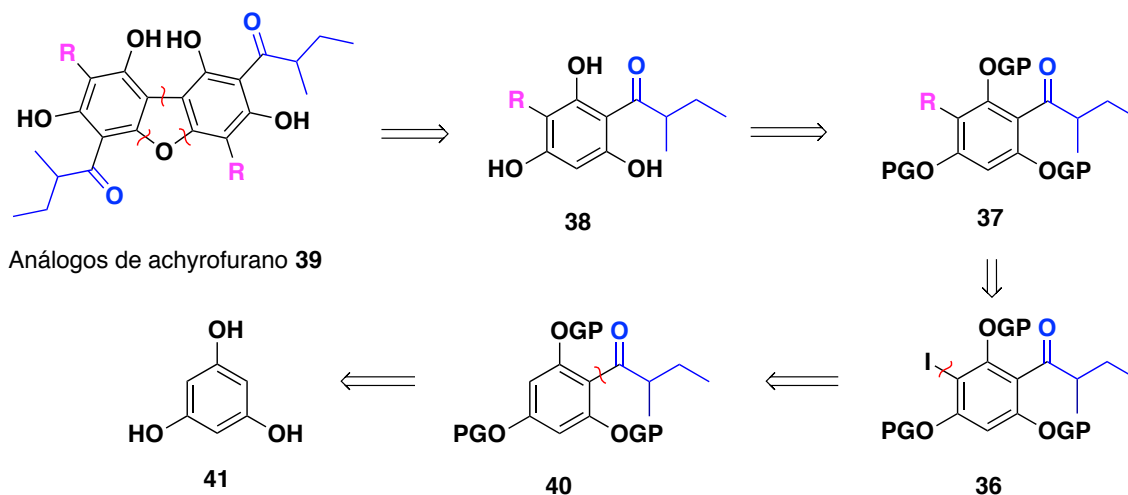
Con el fin de obtener los análogos de achyrofurano con potencial actividad antibacteriana, se planeó una síntesis simétrica, manteniendo las posiciones C-4 y C-8 con restos de α -metilbutirilo e introduciendo diferentes sustituyentes en C-2 y C-6. Con esto, se analizará la

influencia de la sustitución de las cadenas insaturadas por otras alifáticas, y también, por sustituyentes aromáticos (Esquema 2).



Esquema 2. Sitios de diversidad estructural en análogos de achyrofurano.

El análisis retrosintético del dibenzofurano **39** (Esquema 3) inicia, con desconexiones C-C y C-O en el anillo de furano para dar el floroglucinol disustituido **38**. Este intermedio (**38**) se podría obtener a partir de la desprotección del compuesto **37**. Los distintos sustituyentes podrían introducirse aprovechando un acoplamiento de Suzuki-Miyaura entre ácidos borónicos y el derivado yodado (**36**). Finalmente, al realizar escisiones C-C y C-halógeno se podrá llegar al producto de partida floroglucinol comercial **41**.



Esquema 3. Estrategia sintética para la obtención de análogos de achyrofurano.

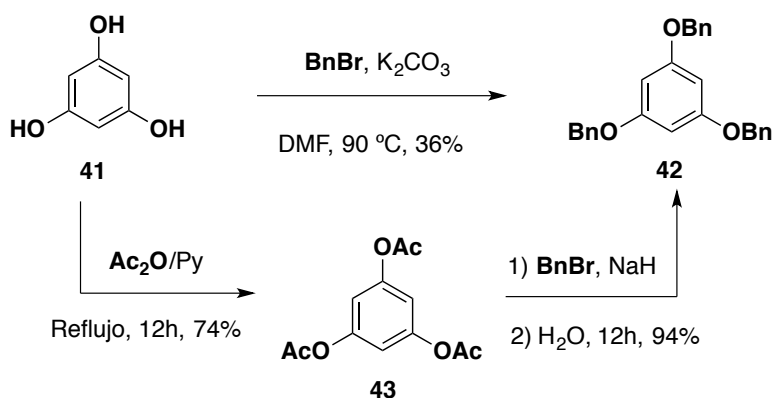
A continuación, se describen las diversas condiciones empleadas que permitieron la obtención de los compuestos en cada etapa de la síntesis total y posterior optimización, así

como, el análisis espectroscópico para la elucidación de las estructuras de estos mismos, para ello, se tomará como ejemplo un compuesto representativo de cada etapa.

2.3.2 Preparación de derivados de floroglucinol

Inicialmente, los grupos hidroxilo se protegieron como éteres metílicos, sin embargo, en la etapa de desprotección de **37** se presentaron problemas con los derivados trimetoxilados en la etapa de desmetoxilación. Por esta razón, se decidió usar alternativamente el radical bencilo como grupo protector.

Para la obtención de 1,3,5-tris(benciloxi)benceno se realizó una *O*-bencilación directa de floroglucinol comercial **41**. Para ello, se mezclaron **41** y bromuro de bencilo (relación 1:1.8 Eq) en DMF, usando K_2CO_3 como base a 90°C y agitación constante durante 30 h ¹⁵⁷. Al realizar el seguimiento por CCD, no se observó la formación del correspondiente éter **42**. Por ello, se decidió aumentar la cantidad de base a 4 Eq, con el fin de forzar a que la reacción transcurriera, estas condiciones proporcionaron **42** con un rendimiento del 36%. Sin embargo, el bajo rendimiento obtenido no era favorable para ser empleado a escala de gramos, por ello, se decidió ensayar otra metodología que obtendría **42** a través del derivado triacetilado **43** ¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Primero, se añade anhídrido acético a una solución de **41** en piridina. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 12 h. Al realizar el seguimiento por CCD se observó la presencia de un solo producto. Posteriormente, el sólido se filtró y se lavó con MeOH, donde se logró obtener **43** con un porcentaje de rendimiento del 74%. Para la segunda parte, se mezcló el triacetato **43** junto con bromuro de bencilo y NaH en DMF, luego se adicionó agua y se dejó a temperatura ambiente durante 12 h ^{158, 160}. Finalmente, se realizó una extracción para obtener el residuo orgánico. Luego, este fue recrystalizado en metanol y se obtuvo el compuesto **42** con 94% de rendimiento (Esquema 4). Con esta última metodología se obtuvieron buenos rendimientos, aunque se adiciona un paso más de reacción. La purificación de los productos es realizada por recrystalización y no por cromatografía.

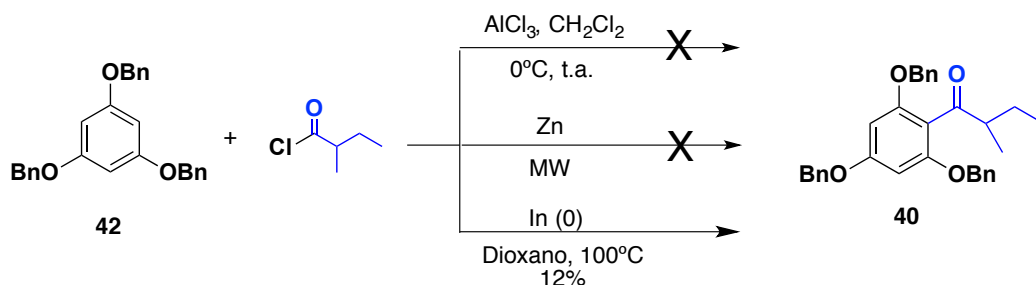


Esquema 4. Metodologías ensayadas para la síntesis de 1,3,5-tris(benciloxi)benceno.

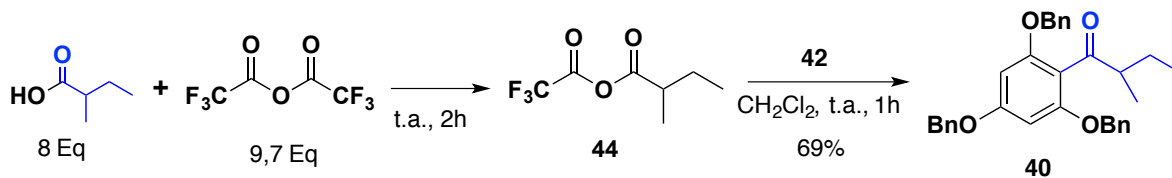
En el espectro de RMN ^1H del compuesto **42**, se observaron las señales de 15 protones aromáticos entre $\delta = 7.26\text{--}7.41$ ppm, correspondientes a los protones de tres anillos bencilicos, como también una señal a $\delta = 5.01$ ppm que integra para 6H correspondiente a los CH_2 bencilicos. Mientras que la señal de los tres protones aromáticos de anillo principal aparece como un singulete a $\delta = 6.28$ ppm (Anexos- Fig. 7). En el espectro de RMN ^{13}C y DEPT-135 (Anexos- Fig. 8) se observaron en total siete señales, de las cuales, dos de ellas corresponden a carbonos cuaternarios (6C), cuatro a terciarios (18CH) y una a secundarios (3 CH_2), estas coinciden con la estructura de **42**, en particular la señal a $\delta = 70.4$ ppm confirma la existencia de CH_2 bencilicos en la estructura.

Para la obtención del compuesto acilado **40**, se realizó acilación de Friedel-Crafts del floroglucinol tribencilado **42** con cloruro de 2-metilbutiroilo racémico, utilizando condiciones clásicas de reacción con AlCl_3 (relación 1: 1.1: 2.5 Eq) en CH_2Cl_2 . Esta reacción condujo a la formación del producto triacilado, debido a la activación del anillo. También se intentó con metodologías que fueran selectivas, en las que solo se obtuviera el producto monoacilado. En una prueba, se utilizó Zn e irradiación con MW en condiciones libres de disolvente¹⁶¹, produciendo una mezcla compleja evidenciada por CCD. Debido a esto, se empleó otra metodología, en la que se mezcló **41** con cloruro de 2-metilbutirilo y se utilizó $\text{In}(0)$ metálico como catalizador (relación 1:1:0.2 Eq), en dioxano, calentando a reflujo durante 15 h, sin resultados favorables¹⁶². Luego, esta misma reacción fue ensayada usando 3 Eq del tribencilado **41** y 1 Eq del metal a las mismas condiciones, obteniendo **40** con 12%

de rendimiento (Esquema 5). Por lo tanto, el tribencilado **42** fue sometido a condiciones de acilación alternativas, utilizando un exceso del anhídrido mixto **44** pre-formado a partir de anhídrido del ácido trifluoroacético (TFAA) y ácido (\pm)-2-metilbutírico. Siguiendo la metodología de Baziny col.¹⁵⁸, primero se formó **44** por medio de la reacción entre el ácido carboxílico (3 Eq) y TFAA (3.6 Eq) en CH_2Cl_2 , al cabo de 5 min se añadió el tribencilado **42** (1 Eq), la reacción fue dejada durante 48 h a temperatura ambiente, pero no se observó por CCD la formación de **40**. Por ello, se modificaron las condiciones, aumentando los equivalentes de TFAA (4.8 Eq) y dejando la reacción por 35 min antes de la adición del tribencilado, así se obtuvo el monoacilado **40** con un rendimiento del 20%. Para favorecer la formación de **44**, se decidió aumentar tanto la cantidad del ácido carboxílico (6 Eq) como del TFAA (7.2 Eq), dejando la reacción por 2h, luego de la adición de **42** se dejó la reacción durante 1h. Estas modificaciones permitieron aumentar el rendimiento a 53%. Diferentes ensayos permitieron llegar a las condiciones óptimas de reacción, las cuales se muestran en el esquema 6.



Esquema 5. Metodologías empleadas para la síntesis del compuesto acilado **40**.

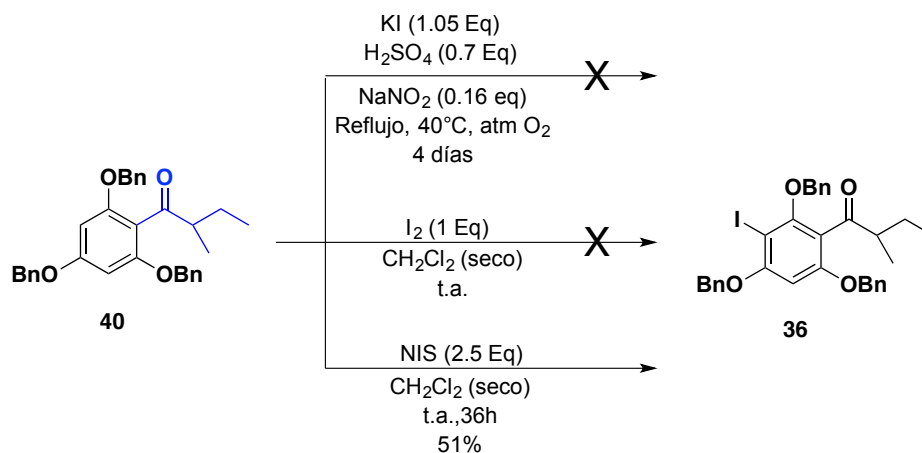


Esquema 6. Condiciones óptimas de reacción para la síntesis del compuesto acilado **40**.

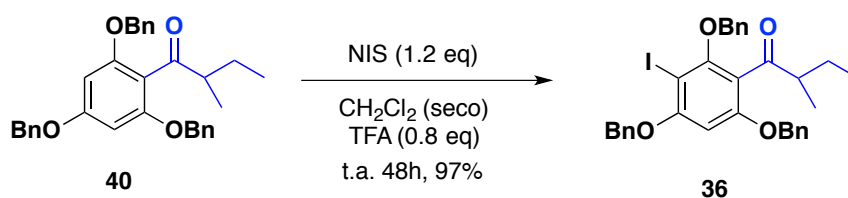
En el espectro de RMN ^1H del compuesto **40**, se observó la presencia de tres multipletes a 1.35, 1.75 y 2.94 ppm integrando cada uno para 1H, un doblete a 1.06 ppm y un triplete a 0.80 ppm integrando cada uno para 3H. Estas cinco señales pertenecen a los grupos CH_3 ,

CH₂ y CH presentes en el fragmento (±)-2-metilbutirilo. Particularmente, la señal a 2.95 ppm pertenece al H alfa al carbonilo. Otra señal que confirma la introducción del acilo aparece a 6.23 ppm como un singlete integrando para 2H, correspondiente a los hidrógenos H-3 y H-5 del anillo de benceno que no han sido sustituidos, también se encuentran dos señales a 5.02 y 4.99 ppm en relación 1:2 que corresponden a los metilenos diferentes pertenecientes a los grupos bencilos de las posiciones 2, 6 y 4 respectivamente (Anexos- Fig. 9). Con los espectros de RMN ¹³C, DEPT-135 y DEPT-90 (Anexos- Fig. 10) se confirmó la existencia de los 5 carbonos del acilo, la señal de carbono carbonílico se observó a δ = 207.9 ppm (C-1'), 2 metilos a 11.7 y 15.2 ppm (C-4' y C-1''), un metino a δ = 49.1 ppm (C-2') y un metileno a δ = 25.4 ppm, este último correspondiente al C-3' de los protones diastereotópicos. Además, se observó a δ = 93.5 ppm la señal de los CH aromáticos C-3 y C-5. El espectro de HR-EIMS para **40**, mostró el ion [M]⁺ a m/z 480.2293 para una fórmula molecular C₃₂H₃₂O₄ correspondiente al peso molecular de 480 Da.

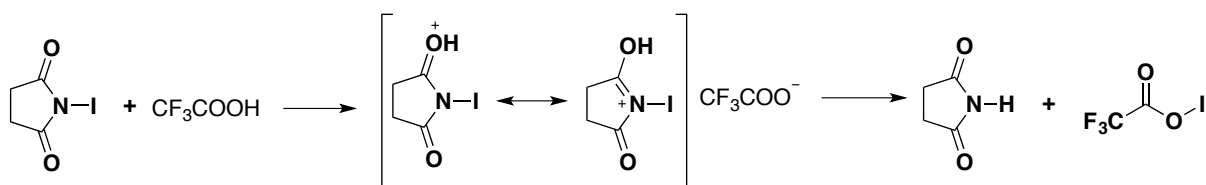
Por otro lado, para la reacción de yodación se probaron diferentes aproximaciones (Esquema 7). En las dos primeras aproximaciones se usó como agente de yodación KI y I₂, pero no se logró obtener el compuesto deseado. Por esta razón se utilizó *N*-yodosuccinimida (NIS) (1.2 Eq)¹⁶³ en CH₂Cl₂ seco, a temperatura ambiente durante 46 h; esta metodología condujo a la formación del compuesto yodado **36** con un 99% de rendimiento. Sin embargo, al escalar, la reacción no fue reproducible. Por tal motivo, fue necesario aumentar los equivalentes de NIS hasta 2.5, obteniendo **36** y el producto diyodado. Estos resultados indicaron que la reacción era dependiente de la concentración. Sin embargo, se encontró que la reacción con NIS en presencia de cantidades catalíticas de ácido trifluoroacético (TFA), era un método eficiente para la yodación de compuestos aromáticos activados¹⁶⁴. Los diferentes ensayos se realizaron variando los equivalentes de NIS y del catalizador, proporcionando las condiciones óptimas de reacción (Esquema 8). Desde el punto de vista mecanístico, la especie activa en esta reacción es probablemente el trifluoroacetato de yodo formado *in situ*, el cual puede actuar como un electrófilo muy reactivo (Esquema 9).



Esquema 7. Metodologías empleadas para la síntesis del compuesto yodado **36**.



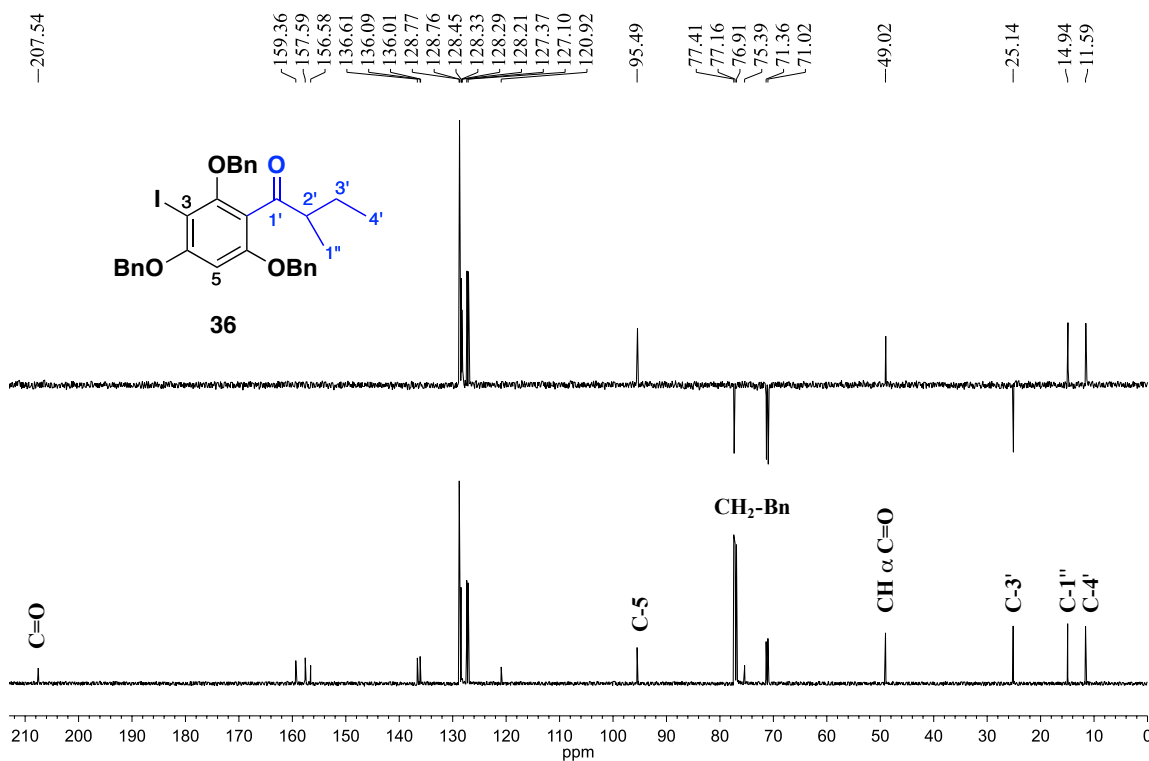
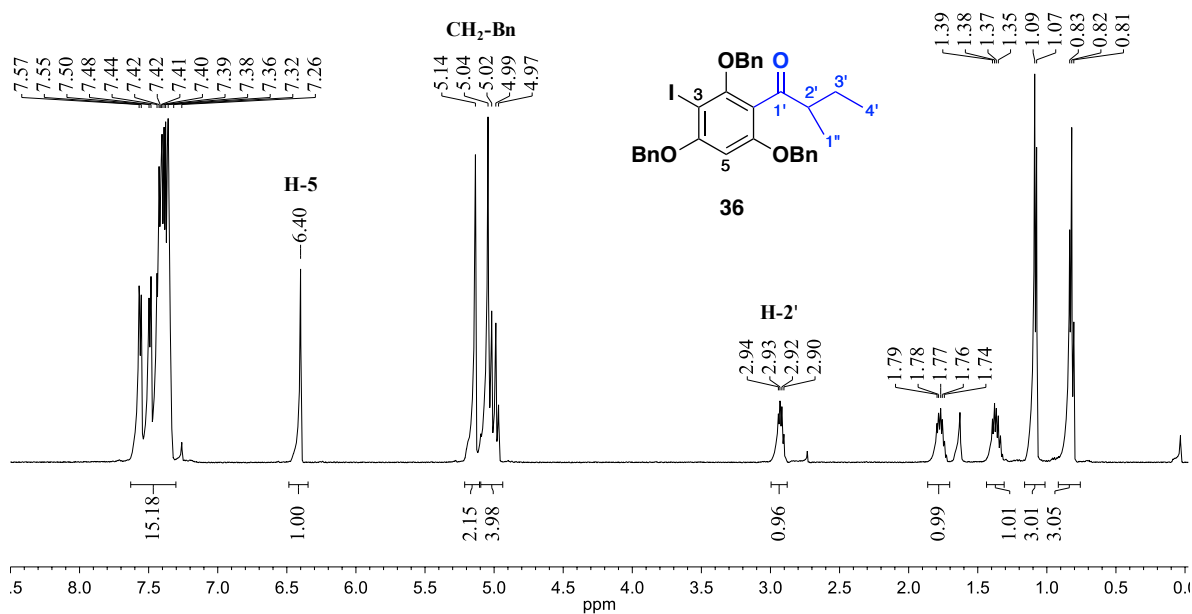
Esquema 8. Condiciones óptimas de reacción para la síntesis del compuesto **36**.



Esquema 9. Especies activas para la yodación.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **36** en CDCl_3 , se observó principalmente un singlete a $\delta = 6.40$ ppm que integra para 1H, que corresponde al H-5 del anillo principal. Además, este espectro mostró dos dobletes a $\delta = 4.95$ y 5.00 ppm, que integran cada uno para 1H, sugiriendo la presencia de un metileno de bencilo con hidrógenos diastereotópicos. Las otras señales de los grupos CH_2 de los dos bencilos restantes aparecieron como singletes a $\delta = 5.02$ y 5.12 ppm (Fig. 42). Las demás señales son similares a las encontradas en el espectro de RMN ^1H de **40**. Con los espectros RMN ^{13}C y DEPT-135 de **36**, se confirmó la

presencia del carbono carbonílico ($\delta = 207.9$ ppm), carbono terciario ($\delta = 95.5$ ppm) C-5 y C-I, confirmando la unión entre carbono y yodo ($\delta = 120.9$ ppm).



El espectro de HR-EIMS para **36**, también corroboró la obtención del compuesto yodado, este mostró un $[M^+]$ a m/z 606.1278, correspondiente a la masa calculada 606.1267 para $C_{32}H_{31}O_4I$ (Anexos- Fig. 11).

2.3.3 Síntesis de derivados de acilfloroglucinol mediante acoplamiento de Suzuki-Miyaura

Con la reacción de acoplamiento se inducirá la diversidad estructural de los análogos, con el fin de evaluar la influencia de los sustituyentes (donadores, aceptores, alifáticos y aromáticos) en la actividad. Los correspondientes acoplamientos de Suzuki-Miyaura se llevaron a cabo con 4 ácidos borónicos y 2 ésteres de ácidos borónicos, para promover diversidad estructural en la molécula. Se obtuvieron las mejores condiciones de reacción bajo calentamiento convencional y asistida por microondas. En todas las reacciones se empleó $Pd(PPh_3)_4$ (20% mol) como catalizador, Na_2CO_3 2% como base. Además, se utilizó 1,4-dioxano o tetrahidrofurano (THF) como disolventes. Todas las reacciones fueron monitoreadas por CCD.

A continuación, se muestran diferentes ensayos para la obtención del derivado de acilfloroglucinol **37a** mediante la reacción entre **36** y éster pinacol del ácido 3-metil-2-butenilborónico **45a**. Este compuesto fue escogido como ejemplo, porque los sustituyentes son estructuralmente similares a los del achyrofurano **9**. Inicialmente se llevó a cabo, el acoplamiento mediante calentamiento convencional, entre el compuesto yodado **36**, éster borónico **45a**, solución acuosa de Na_2CO_3 al 2% (relación 1:4:16) y $Pd(PPh_3)_4$ (20 mol %), en 1,4-dioxano durante 16 h. El seguimiento por CCD mostró la formación de un solo producto, correspondiente al derivado **37a** con 60% de rendimiento. Posteriormente, con el objetivo de mejorar los rendimientos se realizaron otros ensayos variando la relación entre los precursores y el disolvente, sin embargo, no se logró mejorar los rendimientos significativamente (Entrada 2-4 tabla 7). Por ello, se realizó la reacción asistida por MW. Se encontró que la mezcla de reacción a 150°C durante 5 min, en presencia de 6 equivalentes de **45a**, proporcionó el compuesto **37a** en un bajo rendimiento (Entrada 5 tabla 7). Cuando la reacción se realizó a 170°C durante 15 min se obtuvo un rendimiento moderado (Entrada 6 tabla 7), además, al utilizar tiempos más largos y temperaturas más altas no favoreció la

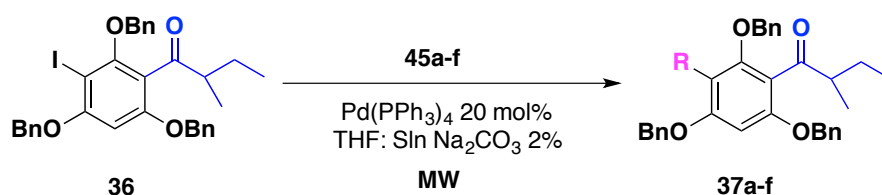
cantidad de producto obtenido (Entrada 7 tabla 7). El cambio del disolvente dioxano por THF tampoco mostró cambios significativos en el rendimiento (Entrada 8-9 tabla 7). Al aumentar los equivalentes de **45a** a 7.0 Eq durante 15 min, esto tuvo un efecto positivo en el rendimiento (Entrada 10 tabla 7). Finalmente, se obtuvieron las mejores condiciones de reacción asistido por MW usando 7 Eq de **45a**, 170°C durante 20 min, obteniendo el producto objetivo con un 91% de rendimiento (Entrada 11 tabla 7).

Tabla 7. Determinación de las condiciones óptimas para la síntesis del derivado de acilfloroglucinol **37a**.

Entrada	Relación 36:45a	Condiciones de Reacción	% Rend.
1	1.0:4.0	1,4-dioxano, Δ , 16 h	60
2	1.0:4.0	1,4-dioxano, Δ , 24 h	77
3	1.0:6.0	1,4-dioxano, Δ , 24 h	44
4	1.0:6.0	THF, Δ , 84 h	73
5	1.0:6.0	1,4-dioxano, MW , 150°C, 5 min	20
6	1.0:6.0	1,4-dioxano, MW , 170°C, 15 min	51
7	1.0:6.0	1,4-dioxano, MW , 180°C, 35 min	30
8	1.0:4.0	THF, MW , 170°C, 30 min	33
9	1.0:6.0	THF, MW , 170°C, 15 min	45
10	1.0:7.0	THF, MW , 170°C, 15 min	55
11	1.0:7.0	THF, MW , 170°C, 20 min	91

Estas condiciones de reacción, se extrapolaron para obtener el compuesto **37b** a partir del ácido *cis*-1-propen-1-ilborónico **45b**, logrando 88% de rendimiento. La extensión de este procedimiento a los restantes organoboranos **45** no proporcionó los mejores rendimientos, para ello se buscaron otras condiciones en este paso de reacción.

La reacción entre **36** y el éster pinacol del ácido alilborónico asistido por MW a diferentes condiciones, nunca mostró la formación del compuesto **37g** (ver sección 2.4.2.5.7). Las pruebas mediante calentamiento convencional a reflujo solo se realizaron con **45a**, **45b** y **45g**, las mejores condiciones fueron encontradas con dioxano, 100 °C y tiempos de reacción mayores a 20h, obteniendo rendimientos de 77, 56 y 32% respectivamente. En general se encontró que los acoplamientos para la obtención de los distintos derivados de acilfloroglucinoles, se obtuvieron con mejor rendimiento realizando la reacción asistido por MW (Esquema 10), las condiciones y resultados son presentados en la tabla 8.



Esquema 10. Acoplamiento de Suzuki-Miyaura para la síntesis de derivados de acilfloroglucinol **37** con irradiación de MW.

Tabla 8. Condiciones óptimas de reacción encontradas para la síntesis de derivados de acilfloroglucinol **37a-g** con irradiación de MW.

Compuesto 37	Organoborano 45	Eq	Disolvente THF:Na ₂ CO ₃	T (°C)	t (min)	% Rend.
a		7	1:1.5	170	20	91
b		7	1:1.5	170	20	88
c		3	1:2	150	20	79
d		3	1:2	150	20	86
e		3	1:2	150	20	65
f		3	1:2	150	20	73

En el espectro de RMN ^1H de **37b** (Fig. 43), se observó un doblete a $\delta = 6.32$ ppm con constante de acoplamiento $J = 11.1$ Hz y un multiplete a $\delta = 5.91$ ppm, estas dos señales indicaron una configuración *cis*, y junto a la señal de doble-doblete a $\delta = 1.59$ ppm ($J = 6.8$, 1.6 Hz) confirmaron los protones de 2-Z-propenil (H-1''', H-2''' y H-3''' respectivamente). De igual forma, las demás señales de los diferentes protones se observaron con el mismo desplazamiento y multiplicidad que los obtenidos en los espectros de RMN ^1H de los anteriores compuestos **36** y **40**. Por su parte, en el espectro de RMN ^{13}C para **37b**, se observó la señal a $\delta = 16.02$ ppm correspondiente a C-3''' (Anexos- Fig. 12).

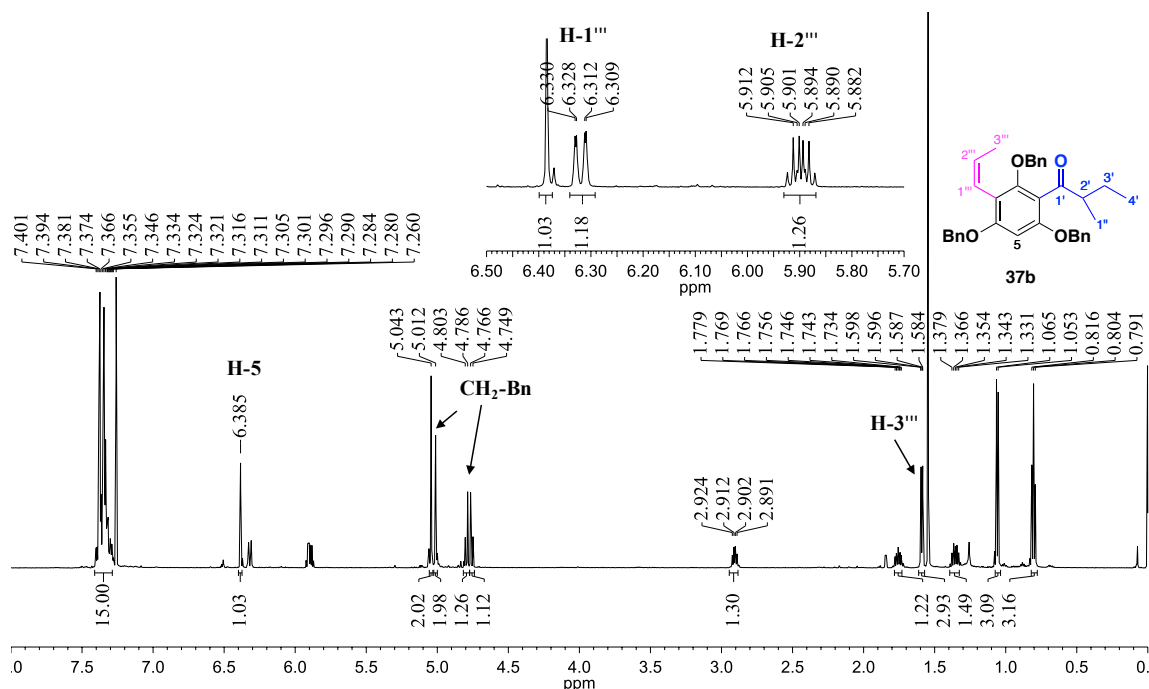
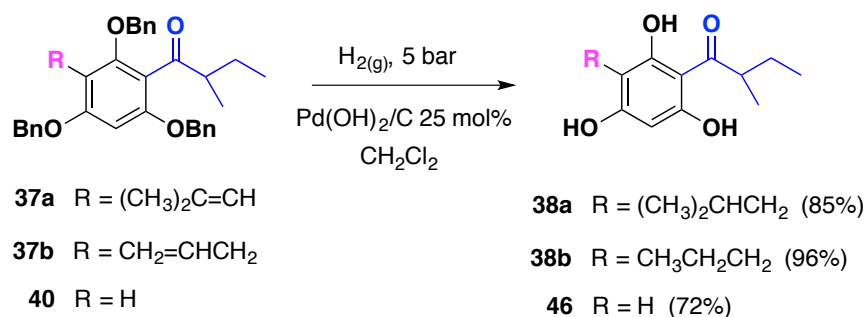


Figura 43. Espectro de RMN ^1H del compuesto **37b**, tomado en CDCl_3 .

2.3.4 Síntesis de acilfloroglucinoles mediante desprotección de grupos ésteres de bencilo

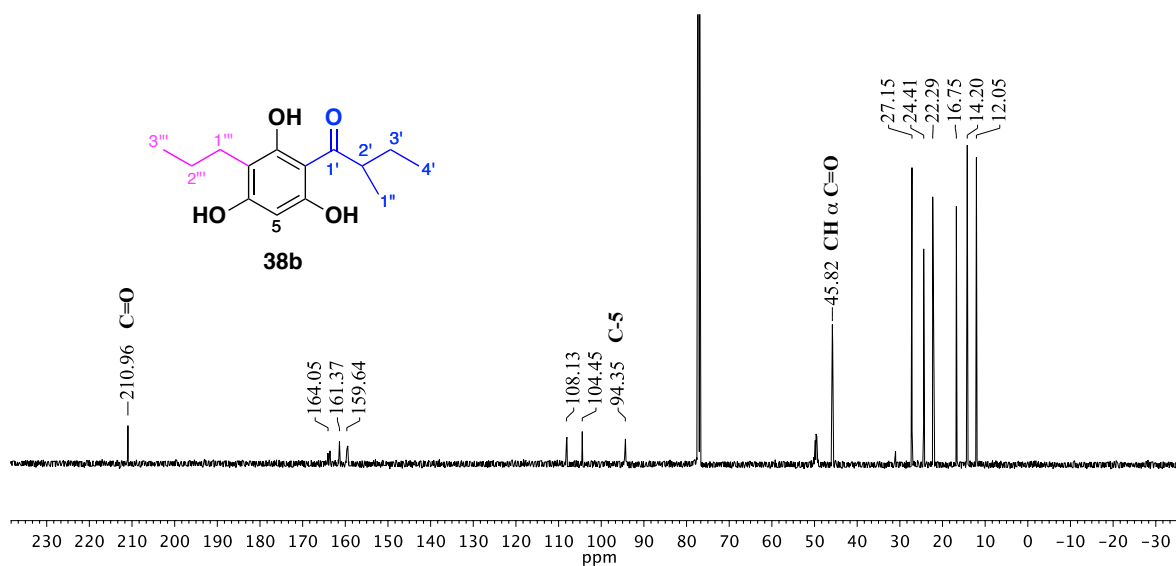
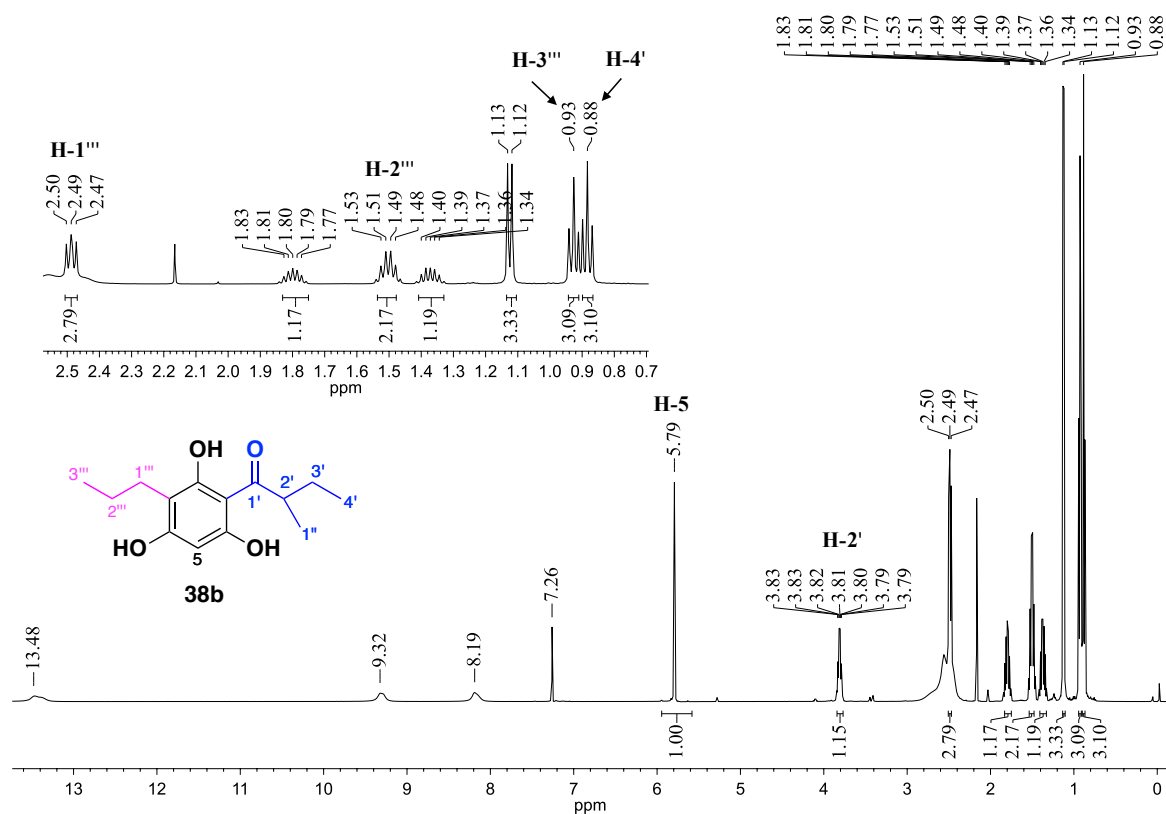
La síntesis de acilfloroglucinoles **38**, se realizó a través de la escisión de los grupos ésteres de bencilo de los derivados de acilfloroglucinoles **37**. Para ello, se ensayaron diferentes condiciones de hidrogenólisis con **37a**. Una de ellas consistió en usar Pd/C en CH_2Cl_2 :EtOH (2:1), al realizar el seguimiento por CCD no se observó la formación de un nuevo producto. Por esta razón, se ensayaron otras metodologías alternativas tales como Na¹⁶⁵, CAN (Ceric ammonium nitrate por sus siglas en inglés)¹⁶⁶⁻¹⁶⁷ o FeCl_3 ¹⁶⁸, con el fin de obtener los

hidroxilos libres sin hidrogenar las cadenas laterales, sin embargo, solo con CAN se obtuvo mezcla de productos monohidroxilados. Cuando se realizó la hidrogenólisis con $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.2 Eq) como catalizador, en CH_2Cl_2 y 5 bar de presión durante 5 h, se observó la presencia de un producto mayoritario por CCD, el cual correspondió al producto trihidroxilado objetivo con un rendimiento del 41%. Posteriormente, se probaron diferentes condiciones aumentando los equivalentes del catalizador y los tiempos de reacción. Las mejores condiciones se encontraron con $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (0.25 Eq), 5 bar de presión de hidrógeno durante 10h. Este procedimiento se extendió a **37b** y **40**, cuya reacción procedió de manera similar. Los rendimientos obtenidos se muestran en el esquema 11.



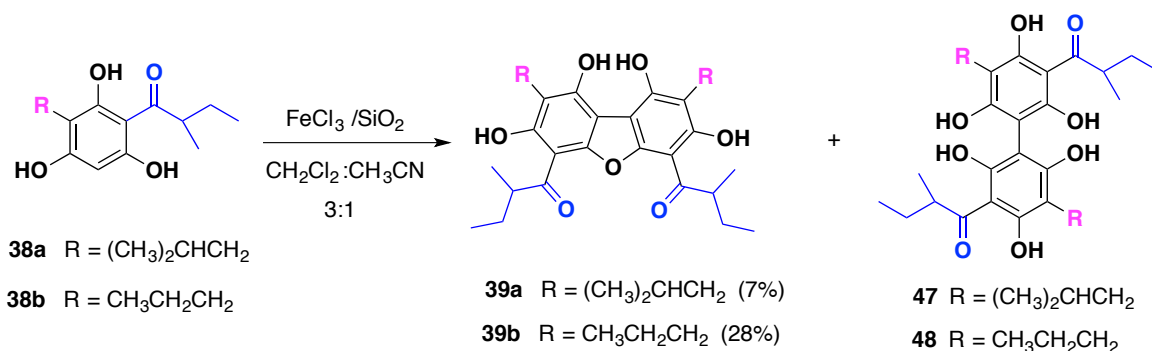
Esquema 11. Condiciones óptimas de reacción para la síntesis de acilfloroglucinoles.

Con el espectro de RMN ^1H se confirmó la formación del floroglucinol **38b** como se observa en la figura 44. Las señales de los protones 2-OH, 4-OH y 6-OH se observaron como tres singuletes anchos a $\delta = 13.48$, 9.32 y 8.19 ppm, por el contrario, las señales de los protones de bencilo del compuesto **37b** desaparecen. Por otro lado, las señales de los protones metilenos (H-1'' y H-2'') y metilo (H-3'') aparecen a $\delta = 2.49$, 1.50 y 0.93 ppm respectivamente, confirmando la hidrogenación del doble enlace en el precursor **37b**. En el espectro RMN ^{13}C (Fig. 45) se observó el total de señales esperadas para el compuesto **37b**. La presencia de las cinco señales de carbonos cuaternarios en la región aromática y un solo carbono terciario a $\delta = 94.4$ ppm, confirma el proceso de reducción y la estructura del compuesto obtenido.



2.3.5 Síntesis de dibenzofuranos acil polioxigenados mediante la ciclación oxidativa de fenoles sustituidos

El último paso de reacción fue la síntesis de análogos de achyrofurano, por medio de la ciclación oxidativa de floroglucinoles disustituídos. Inicialmente, se realizaron pruebas con distintos promotores de reacción, tales como $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ o $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{O}_2$ en ácido acético¹⁶⁹ y también $\text{PIFA-BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ ¹⁷⁰, estas reacciones no mostraron por CCD la formación del nuevo compuesto. Por lo tanto, se empleó la metodología reportada por Keinan and Mazur¹⁷¹, en donde utilizan $\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$, el seguimiento por CCD mostró la formación de dos nuevos productos correspondientes a 2,2'-bifenilo y dibenzofurano. El procedimiento consistió en mezclar FeCl_3 anhidro con SiO_2 en CH_2Cl_2 bajo agitación constante a una temperatura de 40°C , posteriormente se adicionó una solución del compuesto **38b** disuelta en la mezcla diclorometano:acetonitrilo (3:1), la reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 18 min. Finalmente, el crudo de reacción fue filtrado y purificado por CCD preparativa. El dibenzofurano **39b** fue obtenido con un rendimiento del 28%. Cabe resaltar, que parte del compuesto quedó retenido en las placas cromatográficas. Estas condiciones de reacción fueron aplicadas a los fenoles **38a** y **46** (ver sección 2.4.2.6.3). En el caso de **46** la reacción no procedió, por el contrario, cuando se utilizó **38a**, se observó la formación solamente del bifenilo **47**, por ello, fue necesario realizar otra aproximación calentando a 50°C durante 7 h. Después de varias purificaciones se obtuvo el producto **39a** con un 7% de rendimiento (Esquema 12).



Esquema 12. Dimerización oxidativa biomimética para la síntesis de análogos de achyrofurano **39a-b**.

El compuesto **39b** se obtuvo en forma de polvo amarillo. Los resultados de HR-ESI-MS en modo negativo (Anexos- Fig. 13) mostraron un ion m/z 483.2399 (calculado para $[C_{28}H_{36}O_7]^-$ 483.2383), confirmando la formación del dibenzofurano tras dimerización y ciclación oxidativa. Los espectros de RMN 1H de los dibenzofuranos mostraron solo la mitad del conjunto completo de señales, indicando probablemente una estructura simétrica para estos compuestos. La figura 46 muestra el espectro de RMN 1H de **39b** tomado en $CDCl_3$, en el cual se observó la señal del protón del hidroxilo en posición 7 o 3 (cuando se analiza como una estructura simétrica), como un singulete a $\delta = 14.25$ ppm, además, aparece un multiplete a 1.61 ppm que integra para tres protones, correspondiente a los hidrógenos del metileno en C-2''' y un hidrógeno diastereotópico en C-3'. Con ayuda del espectro de HSQC en CD_3OD (Anexos- Fig. 14) se identificó los diferentes protones en la estructura. Con la comparación entre los espectros de RMN ^{13}C , DEPT-135 y DEPT-90 tomados en CD_3OD , se observaron las señales esperadas para el compuesto, se destacan principalmente, la señal de carbono terciario a $\delta = 46.38$ ppm para C-2' y las señales de carbonos cuaternarios aromáticos (Anexos- Fig. 15).

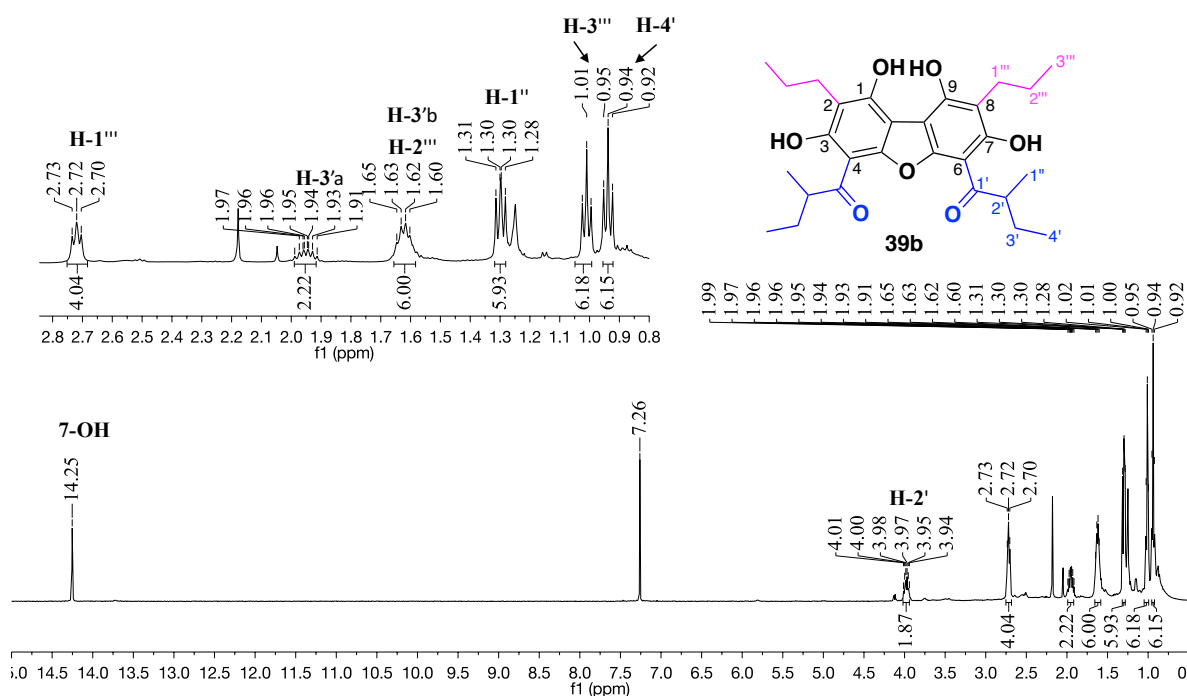


Figura 46. Espectro de RMN 1H del compuesto **39b**, tomado en $CDCl_3$.

La regiosustitución se estableció por las correlaciones observadas en el espectro HMBC. Así, por ejemplo, para el compuesto **39b**, las correlaciones detectadas para los protones H-1''' y protón 7 del grupo hidroxilo, corroboraron la posición de los restos acilo en C-4 y C-6 y las cadenas propilo en C-2 y C-8 (Fig. 47). Esto se analizó por medio de las correlaciones HMBC entre H-1''' a $\delta = 2.67$ ppm con los carbonos C-7, C-8 y C-9 ($\delta = 163.0, 113.6$ y 166.3 ppm respectivamente) y a su vez las correlaciones entre 7-OH con C-6, C-7 y C-8 ($\delta = 102.1, 163.0$ y 113.6 ppm). Así mismo, la correlación a larga distancia entre 7-OH y el carbono cuaternario 155.2 ppm y entre H-1'' ($\delta = 1.31$ ppm) con C-6 confirmó la posición de estos dos carbonos. Los espectros de HMBC para **39b** tomados en diferentes disolventes (MeOD y CDCl_3) son mostrados en Fig. 48 y 49.

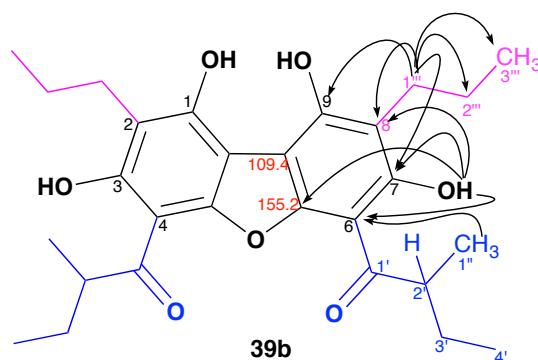


Figura 47. Correlaciones claves en HMBC para el dibenzofurano **39b**.

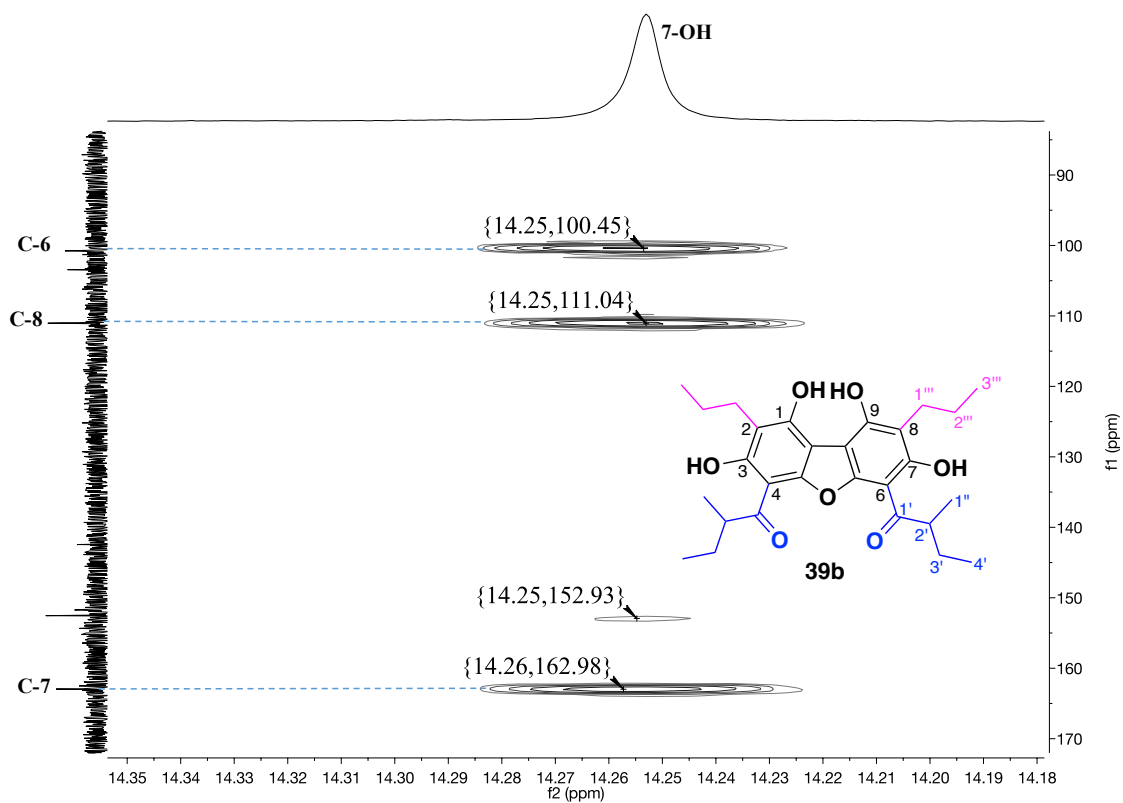


Figura 48. Correlaciones HMBC más importantes para el compuesto **39b** en CDCl_3 .

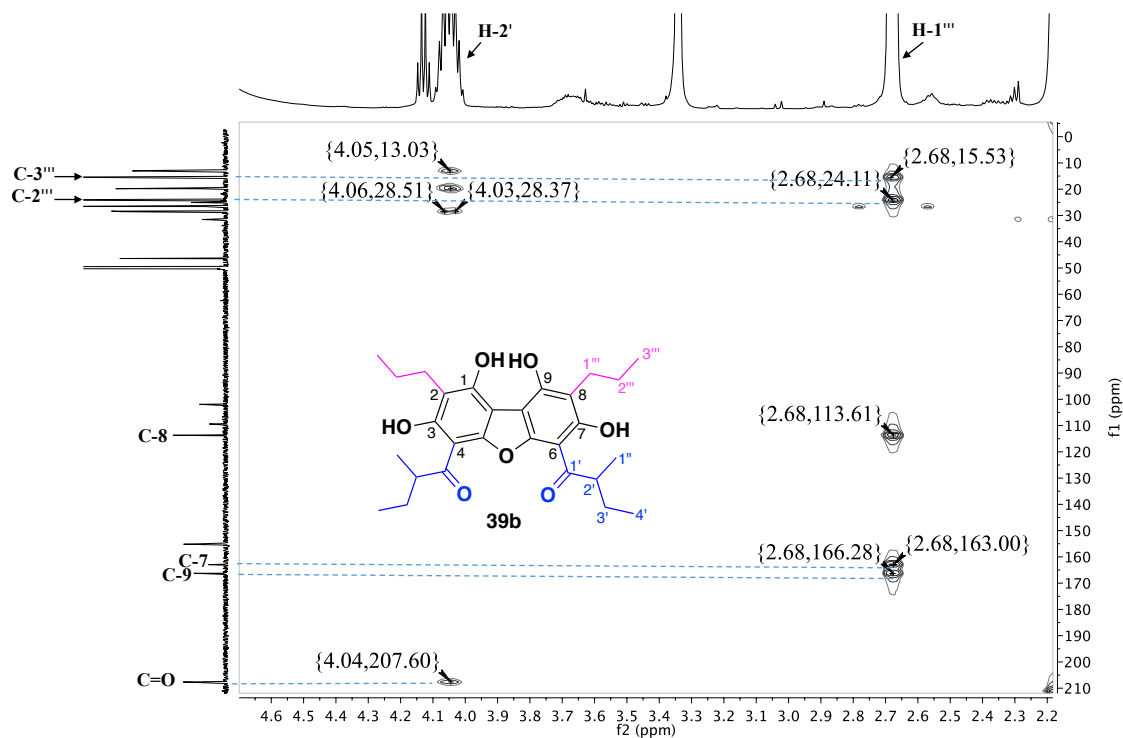


Figura 49. Correlaciones HMBC más importantes para el compuesto **39b** en CD₃OD.

De esta forma, la estructura del compuesto **39b** se asignó como 1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxi-2,8-dipropildibenzo[*b,d*]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona). La formación de un solo regioisómero podría explicarse considerando la conformación mínima de energía del precursor bifenilo **48** (Fig. 51), que muestra dos enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo y los grupos hidroxilo en C-2 y C-2'. Además, se observa otros dos enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos OH-C-2 /OH-C-6' y OH-C-2' /OH-C-6. Todas estas interacciones de enlaces de hidrógeno revelan una gran estabilidad para los bifenilos formados y, probablemente en las condiciones de ciclación, la ruptura de los enlaces de hidrógeno más débiles (OH-C-2 /OH-C-6' y OH- C-2' /OH-C-6) favorece la formación del anillo de furano que implica los hidroxilos en C-6 y C-6'.

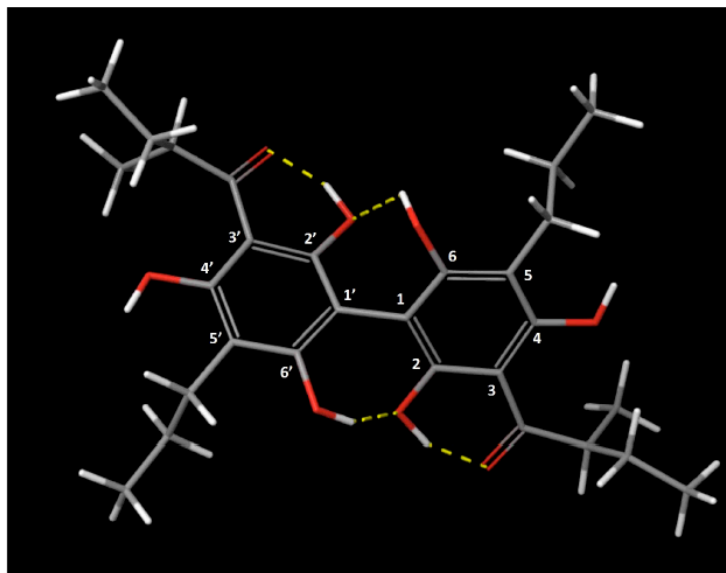


Figura 50. Conformación de energía mínima para el bifenilo **48**.

Finalmente, la síntesis total de los regioisómeros análogos de achyrofurano **39a** y **39b** fue llevada a cabo en 7 pasos. Los compuestos **39a** y **39b** se obtuvieron con un rendimiento global de 2 y 12% respectivamente¹⁷².

2.3.6 Actividad antibacteriana de acilfloroglucinoles y análogos de achyrofurano

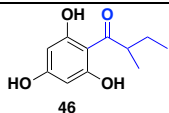
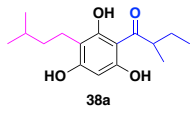
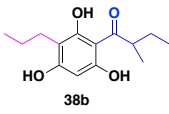
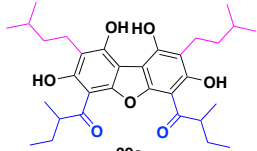
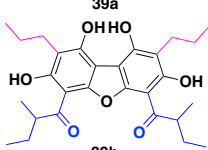
La actividad antibacteriana de acilfloroglucinoles **38a-b**, **46** y dibenzofuranos polioxigenados **39a-b** se determinó contra bacterias Gram-positivas clínicamente relevantes: *Staphylococcus aureus* ATC25923 sensible a la meticilina (MSSA); *S. aureus* NRS402, resistente a la meticilina (MRSA) e intermedio resistente a la vancomicina (VISA); y *Enterococcus faecalis* ATCC29212, la cual ha ido adquiriendo también multiresistencia. Además, se utilizó la referencia *Saccharomyces cerevisiae* cepa BY4741 y sus derivados para comprobar la posible actividad citotóxica en células eucarióticas relacionadas con el daño del ADN, el daño del citoesqueleto o estrés oxidativo. Los resultados se muestran en la tabla 9.

En general, los fenoles **38b** y **46** mostraron resultados similares frente a bacterias Gram-positivas, mientras que el compuesto **38a** mostró un MIC más bajo, sugiriendo que la actividad se vió favorecida cuando hay sustitución con prenilo en C-3. Al comparar las actividades obtenidas de estos compuestos con el antibiótico vancomicina, los resultados mostraron que los acilfloroglucinoles **38a**, **38b** y **46** son moderadamente activos contra bacterias Gram-positivas. Por otro lado, los regioisómeros análogos de achyrofurano mostraron buena actividad antibacteriana frente a las diferentes cepas resistentes, los valores de MIC fueron cercanos a los obtenidos con el producto natural. El dibenzofurano **39a** es tan bueno como vancomicina MIC (4 μ M) frente a la cepa NRS402 (VISA). No obstante, el dibenzofurano **39b** presentó una actividad antibacteriana interesante con valores de MIC 0.5 μ M contra cepas ATCC25923 y ATCC29212, estos valores son más bajos a los obtenidos con achyrofurano, vancomicina y oxaciclina. En ninguno de los compuestos evaluados se obtuvo inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, estos resultados muestran que cadenas ramificadas en C-2 y C-8 disminuyen la actividad y que probablemente la actividad biológica está relacionada con el anillo de dibenzofurano polioxigenado. Sin embargo, es importante evaluar esta actividad biológica con dibenzofuranos que no presenten cadenas de alquilo en C-2 y C-8 y además que no presenten el resto α -metilbutirilo en C-4 y C-6, así mismo, realizar estudios de docking

molecular que ayuden a esclarecer la influencia de los sustituyentes y poder determinar la relación estructura-actividad.

Tabla 9. Resultados de actividad antibacteriana y actividad citotóxica (MIC en μM o $\mu\text{g/mL}$) de acilfloroglucinoles y regioisómeros análogos de achyrofurano.

Compuesto y/o Fármaco	ATCC29212 <i>E. faecalis</i>		NRS402 <i>S. a. (VISA)</i>		ATCC25923 <i>S. a. (MSSA)</i>		Cepas variadas (<i>S. cerevisiae</i>) ^{b)}	
	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$
 46	64	13.44	32	6.72	64	13.44	>128	>30
 38a	32	8.96	32	8.96	32	8.96	>128	>30
 38b	64	16.13	64	16.13	64	16.13	>128	>30
 39a	2	1.08	4	2.16	4	2.16	>128	>30
 39b	0.5	0.24	0.5	0.24	0.5	0.24	>128	>30
Achyrofurano 9	0.5	0.28	0.25	0.14	0.5	0.28	>128	>30
Oxaciclina ^{a)}	9.5	4	150	64	≤ 0.3	≤ 0.125	ND	ND
Vancomicina ^{a)}	1.4	2	5.5	8	0.7	1	ND	ND

^{a)} Estos antibióticos se usaron en un intervalo de 0.125 a 128 $\mu\text{g/mL}$, y la MIC representada en μM se calculó a partir del peso molecular de sus formulaciones comerciales (oxaciclina de sodio y clorhidrato de vancomicina). La oxaciclina es una versión mejorada de metilicina que ha sustituido a esta última en uso clínico. ND, no determinado.

^{b)} Esta columna resume los resultados de cuatro cepas de *S. cerevisiae*: BY4741 (referencia de tipo salvaje), *rad52Δ rad9Δ* (hipersensible al daño del ADN), *mad2Δ* (hipersensible a la despolimerización de microtúbulos) y *yap1Δ* (hipersensible al estrés oxidativo). Para la mayoría de los compuestos no hubo inhibición del crecimiento en absoluto: el crecimiento a 128 μM fue similar al control (DMSO 1% v/v) en las cuatro cepas. Sólo los trifenoles 38a y 38b dieron un ligero retraso de crecimiento en *yap1Δ*: Después de 24 h de incubación,

un crecimiento de 20-40% a 128 μ M con respecto al DMSO (ni observado a 64 μ M x 24h ni a 128 μ M x 48h).
Esto indica que estos dos fenoles podrían ser estresores oxidativo débiles.

2.4 SECCIÓN EXPERIMENTAL

En esta sección se describe las condiciones, equipos de medición y la metodología sintética, que se emplearon para la preparación y caracterización de los nuevos compuestos.

2.4.1 Instrumentación general y reactivos

Todos los reactivos usados en la síntesis de los compuestos fueron adquiridos comercialmente a excepción del catalizador $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, sintetizado siguiendo la metodología de Coulson y col.¹⁷³. Los reactivos comerciales se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. y Alfa Aesar y se utilizaron en su forma comercial sin purificación. Las reacciones de hidrogenación catalítica fueron realizadas en un aparato de hidrogenación-agitador Anton-Parr. Para las reacciones asistidas por microondas se utilizó un Biotage Initiator 2.5, usando viales de vidrio sellados para microondas (2 a 5 mL) y un nivel de absorción normal. El análisis por CCD se desarrolló en placas de sílica gel (20 × 20 cm) Polygram SIL G/UV 254, usando una lámpara UV (254 y 360 nm). Algunos productos fueron purificados por cromatografía de columna sobre gel de sílice Merck 60 de diámetro 0.063 a 0.2 mm. La preparación de las columnas se realizó mediante los procedimientos habituales de compactación con el eluyente. Algunos compuestos fueron purificados con CCD-preparativa, usando placas pre-recubiertas SIL G-100 UV 254 (*Macherey-Nagel*) y placas de sílica gel GF (20 × 20 cm) con base de vidrio y 1 mm de espesor (*Analtech*). La cromatografía de exclusión por tamaño fue realizada con Sephadex LH-20. En la purificación de los dibenzofuranos se usó HPTLC, *Macherey-Nagel*. Los espectros de RMN (1D y 2D) se realizaron en espectrometros Bruker Avance (para RMN ^1H a 500 o 600 MHz, y para RMN ^{13}C a 126 o 150 MHz). Los espectros de masas de baja resolución fueron tomados en un espectrometro VG Micromass ZAB-2F. Los espectros de HR-MS en modo positivo y negativo fueron obtenidos en un equipo Micromass LCT-TOF Premier XE (Ion Trap-Time Of Flight) con ESI. Los espectros de IR se tomaron en un espectrofotómetro Bruker IFS 28/55, depositando una película del compuesto con CH_2Cl_2 seco sobre un disco de NaCl. Los puntos de fusión (P.f.) se midieron con un fusiómetro Büchi (B-540).

2.4.2 Síntesis de derivados de floroglucinol

2.4.2.1 Síntesis de 1,3,5-triiltriacetatobenceno (43)

Siguiendo la metodología reportada para la preparación de este compuesto¹⁵⁸, se añadió anhídrido acético (15 mL, 0.16 mol) a una solución de floroglucinol **41** (4.00 g, 31.7 mmol) en piridina seca (20 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo a 130°C durante 14h. Después de observar la precipitación de un sólido, se eliminó la piridina a presión reducida, se hicieron lavados con metil *terc*-butil éter y se obtuvo el compuesto **43** (5.92 g, Rend.: 74%). Los datos obtenidos en RMN fueron confirmados con los reportados en la literatura¹⁷⁴.

2.4.2.2 Síntesis de 1,3,5-tris(benciloxi)benceno (42)

Siguiendo la metodología de Baziny col.¹⁵⁸, se disolvió el triacetato **43** (2.00 g, 7.93 mmol) junto con bromuro de bencilo (3.40 mL, 28.0 mmol) e hidruro de sodio (60% en aceite mineral, 2.30 g, 57.5 mmol) en DMF (30 mL). La mezcla de reacción fue enfriada a 0°C, se agregó agua (0.42 mL, 23.3 mmol) gota a gota con una jeringa y se observó la liberación de gas. La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 12h. Posteriormente, se vertió la mezcla de reacción sobre agua (20 mL) y se extrajo la fase acuosa con AcOEt (3 × 20 mL). Las fases orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera, secadas sobre MgSO₄ anhidro, filtradas y concentradas a presión reducida. Finalmente, el residuo obtenido se recrystalizó en metanol y se obtuvo el compuesto **42** (2.94 g, Rend.: 94%)¹⁷⁵.

2.4.2.3 Síntesis de 2-metil-1-(2,4,6-tris(benciloxi)fenil)butan-1-ona (40)

En un balón seco, se mezcló anhídrido trifluoroacético (2.42 mL, 17.2 mmol) y ácido (±)-2-metilbutírico (1.60 mL, 14.4 mmol). Después de 2 h de agitación vigorosa a temperatura ambiente, la solución amarilla fue enfriada en un baño de hielo a 0°C y una solución de floroglucinol tribencilado **41** (700 mg, 1.77 mmol) en CH₂Cl₂ (25 mL) fue adicionada lentamente. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente, la reacción fue detenida con NaHCO₃ acuoso saturado (20 mL) y agitada por 4 h más, hasta que terminó la liberación de gas. La fase acuosa se extrajo con AcOEt y las fases orgánicas combinadas se secaron con MgSO₄, se filtraron y concentraron a presión

reducida. Finalmente, el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna de silica gel (eluyente: *n*-hexano/éter dietílico 9:1) y se obtuvo el compuesto **40** (604 mg, Rend.: 71%).

2.4.2.4 Síntesis de 1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-iodofenil]-2-metilbutan-1-ona (36)

El compuesto acilado **40** (488 mg, 1.02 mmol) fue disuelto en diclorometano seco (40 mL) y la disolución fue enfriada a 0°C. Después, se adicionó lentamente *N*-yodosuccinimida (589 mg, 2.54 mmol) en CH₂Cl₂ (80 mL) utilizando un embudo de adición de presión compensada. Seguidamente, se agregó ácido trifluoroacético (0.048 mL, 0.621 mmol) en cuatro porciones cada 2 h con una jeringa. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 h hasta el consumo del compuesto de partida (monitoreada por CCD). La reacción se detuvo añadiendo Na₂S₂O₃ acuoso saturado (50 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución de salmuera, se secaron con MgSO₄, se filtraron y concentraron a presión reducida. El residuo orgánico se re-disolvió con AcOEt y se precipitó la succinimida adicionando *n*-hexano. El sólido se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Finalmente, el residuo resultante se recrystalizó usando la mezcla éter dietílico: *n*-hexano (5:1) y se obtuvo el compuesto **36** (597 mg, Rend.: 97%).

2.4.2.5 Procedimiento general para la síntesis de derivados de acilfloroglucinol mediante la reacción de Suzuki-Miyaura

Método A. Usando calentamiento convencional: El compuesto iodado **36**, el correspondiente organoborano (ácido borónico o éster borónico adicionando 4 Eq), el catalizador Pd(PPh₃)₄ (20 mol %) y una solución de Na₂CO₃ acuoso al 2% (4 equivalentes con respecto al organoborano) como base, fueron adicionados sucesivamente en un balón con agitador magnético y disueltos en 1,4-dioxano bajo atmósfera de argón. Luego, la mezcla fue calentada a reflujo durante 24h aproximadamente. La reacción fue monitoreada por CCD y se detuvo al observar el consumo del organoborano. Posteriormente, la reacción fue llevada a temperatura ambiente y se realizó una extracción agregando agua y AcOEt. Las fases

orgánicas combinadas fueron secadas con MgSO_4 , filtradas y concentradas a presión reducida. Se realizó el mismo proceso de purificación usado en el anterior método para el crudo de reacción.

Método B. Usando calentamiento asistido por microondas: El compuesto iodado **36**, el correspondiente organoborano (ácido borónico o éster borónico adicionando de 3-7 equiv.), el catalizador $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (20 mol%) y una solución de Na_2CO_3 acuoso (1.5 mL, 0.289 mmol) como base, fueron adicionados sucesivamente en un tubo sellado con agitador magnético y disueltos en THF o 1,4-dioxano bajo atmósfera de argón. Después, la mezcla de reacción fue calentada entre 150 a 170°C, usando calentamiento asistido por microondas. La reacción fue monitoreada por CCD y se detuvo al observar el consumo del compuesto iodado **36**. Posteriormente, se realizó una extracción agregando agua y AcOEt. Las fases orgánicas combinadas fueron secadas con MgSO_4 , filtradas y concentradas a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado directamente en una placa de CCD preparativa (SiO_2) para proporcionar el compuesto deseado.

2.4.2.5.1 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(3-metilbut-2-enil)fenil]butan-1-ona (37a)

A. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (20.3 mg, 0.033 mmol), éster pinacol del ácido 3-metil-2-butenilborónico **45a** (0.054 mL, 0.23 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.7 mg, 0.007 mmol) y una solución acuosa de Na_2CO_3 al 2% (1.5 mL, 0.289 mmol) en THF (1.0 mL), irradiada a 170°C por 20 min, formó el compuesto **37a** (17.7 mg, Rend.: 97%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (9:1). **B.** Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (20.0 mg, 0.033 mmol), éster pinacol del ácido 3-metil-2-butenilborónico **45a** (0.030 mL, 0.132 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (7.6 mg, 0.007 mmol) y una solución de Na_2CO_3 acuosa al 2% (2.8 mL, 0.538 mmol) en 1,4-dioxano (3.0 mL) a reflujo por 24h, formó el compuesto **37a** (13.8 mg, Rend.: 77%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/ CH_2Cl_2 (1:1).

2.4.2.5.2 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-(Z)-propenil)fenil]butan-1-ona (**37b**)

A. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (24.8 mg, 0.041 mmol), éster pinacol del ácido *cis*-1-propen-1-ilborónico **45b** (14.8 mg, 0.164 mmol), Pd(PPh₃)₄ (9.5 mg, 0.008 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (3.46 mL, 0.667 mmol) en 1,4-dioxano (4.0 mL), a reflujo por 24h, formó el compuesto **37b** (12.0 mg, Rend.: 56%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (7:3). **B.** Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (22.7 mg, 0.037 mmol), éster pinacol del ácido *cis*-1-propen-1-ilborónico **45b** (23.7 mg, 0.26 mmol), Pd(PPh₃)₄ (8.7 mg, 0.007 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (1.5 mL, 0.289 mmol) en THF (1.0 mL), a 170°C por 20 min, formó el compuesto **37b** (17.2 mg, Rend.: 88%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (7:3).

2.4.2.5.3 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-fenil)fenil]butan-1-ona (**37c**)

B. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (22.5 mg, 0.037 mmol), ácido fenilborónico **45c** (14.3 mg, 0.111 mmol), Pd(PPh₃)₄ (8.6 mg, 0.007 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (1.5 mL, 0.289 mmol) en THF (0.7 mL), a 150°C por 20 min, formó el compuesto **37c** (16.2 mg, Rend.: 79%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (9:1).

2.4.2.5.4 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-(4'-metoxi)fenil)fenil]butan-1-ona (**37d**)

B. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (23.4 mg, 0.039 mmol), ácido 4-metoxifenilborónico **45d** (18.5 mg, 0.116 mmol), Pd(PPh₃)₄ (8.9 mg, 0.008 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (1.5 mL, 0.289 mmol) en THF (0.7 mL), a 150°C por 20 min, formó el compuesto **37d** (19.8 mg, Rend.: 86%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (9:1).

2.4.2.5.5 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-(4'-trifluorometil)fenil)fenil]butan-1-ona (**37e**)

B. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (28.0 mg, 0.046 mmol), ácido 3-trifluorometilfenilborónico **45e** (26.3 mg, 0.139 mmol), Pd(PPh₃)₄ (10.7 mg, 0.009 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (1.5 mL, 0.289 mmol) en THF (0.7 mL), a 150°C por 20 min, formó el compuesto **37e** (18.7 mg, Rend.: 65%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (9:1).

2.4.2.5.6 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(3-furanil)fenil]butan-1-ona (**37f**)

B. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (20.0 mg, 0.033 mmol), ácido 3-furanilborónico **45f** (11.4 mg, 0.099 mmol), Pd(PPh₃)₄ (22.8 mg, 0.019 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (1.5 mL, 0.289 mmol) en THF (0.7 mL), a 150°C por 20 min, formó el compuesto **37f** (13.1 mg, Rend.: 73%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (9:1).

2.4.2.5.7 Síntesis de 2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(2-alil)fenil]butan-1-ona (**37g**)

A. Siguiendo el procedimiento general, la reacción entre **36** (33.3 mg, 0.055 mmol), éster pinacol del ácido alilborónico (0.042 mL, 0.219 mmol), Pd(PPh₃)₄ (12.7 mg, 0.011 mmol), TBAF (0.011 mL, 0.011 mmol) y una solución acuosa de Na₂CO₃ al 2% (4.6 mL, 0.878 mmol) en 1,4-dioxano (4.0 mL), a reflujo por 20h, formó el compuesto **37g** (9.0 mg, Rend.: 32%). En la purificación se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano/AcOEt (8:2).

2.4.2.6 Procedimiento general para la obtención de acilfloroglucinoles

En un tubo de ensayo se depositaron, el compuesto acoplado y el catalizador Pd(OH)₂/C (25 mol %), después fueron disueltos en CH₂Cl₂ o THF (4 mL). La mezcla de reacción fue hidrogenada bajo una presión de 5 bar y a temperatura ambiente hasta la formación de un solo producto (monitoreado por CCD). La suspensión resultante fue filtrada sobre celita con CH₂Cl₂, AcOEt y MeOH como eluyentes y concentrada a presión reducida. El crudo de

reacción fue purificado directamente por cromatografía de exclusión por tamaño usando Sephadex LH-20 y eluyendo con *n*-hexano: CH₂Cl₂: MeOH (2:2:1).

2.4.2.6.1 Síntesis de 2-metil-1-(2,4,6-trihidroxil-3-isopentilfenil)butan-1-ona (**38a**)

Siguiendo el procedimiento general la reacción entre **37a** (188.0 mg, 0.086 mmol), Pd(OH)₂/C (20% p/p, 60.1 mg, 0.086 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL) formó el compuesto **38a** (82.0 mg, Rend.: 85%). La hidrogenación se mantuvo por 9h.

2.4.2.6.2 Síntesis de 2-metil-1-(2,4,6-trihidroxil-3-propilfenil)butan-1-ona (**38b**)

Siguiendo el procedimiento general la reacción entre **38a** (186.0 mg, 0.357 mmol), Pd(OH)₂/C (20% p/p, 62.7 mg, 0.089 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) formó el compuesto **38b** (86.1 mg, Rend.: 96%). La hidrogenación se mantuvo por 9h.

2.4.2.6.3 Síntesis de 2-metil-1-(2,4,6-trihidroxifenil)butan-1-ona (**46**)

Siguiendo el procedimiento general la reacción entre **40** (195.0 mg, 0.408 mmol), Pd(OH)₂/C (20% p/p, 71.6 mg, 0.102 mmol) en THF (4 mL) formó el compuesto **46** (62.0 mg, Rend.: 72%). La hidrogenación se mantuvo por 14h. Los datos obtenidos en RMN fueron confirmados con los reportados en la literatura¹⁷⁶.

2.4.3 Síntesis de dibenzofuranos acil polioxigenados

2.4.3.1 Síntesis de 1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxil-2,8-diisopentildibenzo[b,d]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona) (**39a**)

En un balón seco, se preparó una suspensión de FeCl₃ anhidro (293.2 mg, 1.75 mmol) en SiO₂ (4.38 g, 73.0 mmol) en CH₂Cl₂ (13.5 mL) bajo agitación a 40°C y en atmósfera de argón. Después, se adicionó gota a gota una solución de fenol **38a** (119.9 mg, 0.428 mmol) en CH₂Cl₂:CH₃CN (3:1) (1.4 mL). Seguidamente, la reacción fue agitada vigorosamente y colocada a reflujo a 50°C durante 7 h (monitoreada por CCD). La mezcla de reacción fue filtrada sobre celita con CH₂Cl₂ y concentrada a presión reducida. El residuo obtenido fue

purificado primero por cromatografía preparativa en capa delgada (SiO₂) y luego por HPTLC (High-performance thin-layer chromatography por sus siglas en inglés). En las dos purificaciones se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano: AcOEt (7:3) y se obtuvo el dibenzofurano **39a** (8.2 mg, Rend.: 7%).

2.4.3.2 Síntesis de 1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxi-2,8-dipropildibenzo[b,d]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona) (39b)

En un balón seco, se preparó una suspensión de FeCl₃ anhidro (201.3 mg, 1.20 mmol) en SiO₂ (3.01 g, 50.2 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL), bajo agitación a temperatura ambiente y en atmósfera de argón. Después, se adicionó gota a gota una solución de fenol **38b** (74.1 mg, 0.294 mmol) en CH₂Cl₂:CH₃CN (3:1) (1.47 mL). Seguidamente, la reacción fue agitada vigorosamente durante 18 min a temperatura ambiente (monitoreada por CCD). La mezcla de reacción fue filtrada sobre celita con CH₂Cl₂ y concentrada a presión reducida. El residuo obtenido fue purificado primero por cromatografía preparativa en capa delgada (SiO₂) y luego por HPTLC. En las dos purificaciones se usó como eluyente la mezcla *n*-hexano: AcOEt (7:3) y se obtuvo el dibenzofurano **39b** (20.0 mg, Rend.: 28%).

2.4.4 Caracterización de compuestos obtenidos (Anexos)

2.4.5 Evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados acilfloroglucinoles y dibenzofuranos

2.4.5.1 Cepas bacterianas

Los estudios de actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos fueron llevados a cabo en la Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Tenerife- España, en colaboración con el Instituto Universitario de Bio-orgánica Antonio González de la Universidad de La Laguna. Se seleccionó un conjunto de bacterias representativas cuya importancia clínica en la resistencia a múltiples antibióticos es ampliamente reconocido. Se utilizó bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina ATCC25923 (MSSA); *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina NRS402, que también es intermedio resistente a la vancomicina (VISA); y

Enterococcus faecalis ATCC29212. Las diferentes cepas bacterianas fueron almacenadas a -80 °C en caldo de infusión de corazón cerebral con glicerol al 20%. Las cepas se revivieron con caldo BHI (infusión de corazón cerebral) y se incubaron a 37 °C durante la noche.

2.4.5.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC)

La actividad antimicrobiana se determinó siguiendo el método estándar de microdilución en caldo descrito por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico¹⁷⁷. La MIC se determinó midiendo el crecimiento bacteriano después de 24 h. La suspensión bacteriana se normalizó a continuación en caldo Mueller-Hinton (MH) y se añadió a diluciones en serie 1:2 de cada compuesto y antibióticos de control. El intervalo de concentraciones fue de 0.125 a 128 (μM para los compuestos ensayados y μg/mL para oxacilina de sodio y clorhidrato de vancomicina) y el volumen final fue de 200 μL (en microplaca de 96 pocillos). El tamaño del inóculo fue de 1×10^5 UFC/mL para todas las bacterias.

CONCLUSIONES

Área de química de productos naturales:

- Se determinó que la concentración mínima insecticida del extracto de diclorometano de hojas de *T. diversifolia*, a la cual tiene actividad sobre hormigas de *A. cephalotes* es 500 ppm, pues esta concentración causó el 70% de mortalidad en 9 días.
- El extracto de diclorometano de hojas de *T. diversifolia* a 1000 ppm presentó la mayor actividad insecticida al causar el 70% de mortalidad de obreras de *A. cephalotes* a los cinco días post-ingestión.
- La actividad acetilcolinesterasa de extractos de acetato de etilo y diclorometano (IC₅₀ 65.63 y 73.92 µg/mL, respectivamente) de hojas de *T. diversifolia*, fueron más bajos que aquellos de las fracciones de diclorometano, demostrando que la actividad acetilcolinesterasa es más potente cuando se usa el extracto crudo y no fracciones depuradas.
- La actividad insecticida de *T. diversifolia* sobre *A. cephalotes*, es debida a metabolitos secundarios inhibidores de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa, lo cual concuerda con la falta de movimiento e inactividad observada en las hormigas en los bioensayos.
- Del extracto butanólico de las hojas *T. diversifolia* se aislaron, un nuevo derivado de ácido cafeico, ácido (*E*)-3-(((3-(3,4-dihidroxifenil)acrilil)oxi)metil)-2-metiloxirane-2-carboxílico (**1**) y 6 ácidos cafeoilquínicos conocidos, ácido 4,5-di-*O*-dicafeoilquínico (**2**), ácido 3,4-di-*O*-dicafeoilquínico (**3**), ácido 3,5-di-*O*-dicafeoilquínico (**4**), ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**5**), ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**6**) y ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**7**). Adicionalmente, el compuesto **1** es reportado por primera vez en la literatura y los compuestos **2** y **3** por primera vez en *T. diversifolia*.

- La capacidad antioxidante determinada con el radical DPPH, mostró que los compuestos dicafeoilquínicos **2** y **3** son más activos que los monocafeoilquínicos **5**, **6** y **7**, sugiriendo que la actividad se ve favorecida cuando se tiene dos grupos dicafeoilos en la molécula. En cuanto a la actividad antioxidante del compuesto **1**, presentó un valor de FRS_{50} de $43.8 \pm 0.42 \mu\text{M}$, mostrando que es débilmente activo en comparación al valor encontrado por el control quercetina.
- La mejor capacidad captora de radicales libres DPPH entre isómeros ácidos monocafeoilquínicos **5**, **6** y **7** (3-CQA 36.5 ± 3.22 , 4-CQA 101.8 ± 4.03 y 5-CQA $37.5 \pm 0.37 \mu\text{M}$ respectivamente), es obtenida con las posiciones 3- y 5-O-, confirmando los resultados encontrados en la literatura.
- Se determinó el poder antioxidante reductor de hierro (FRAP) de los diferentes compuestos. El compuesto **2** (4,5-diCQA) mostró un poder antioxidante moderado ($3.4 \pm 0.53 \mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\mu\text{M}$), indicando que la posición sustituida 4,5- (eq, eq) ayuda a la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} en di-CQA.

Área de síntesis orgánica:

- El acoplamiento de Suzuki-Miyaura entre organoboranos, el compuesto yodado (1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-iodofenil]-2-metilbutan-1-ona) y $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ bajo radiación de microondas usando THF con tiempos de reacción menores a 20 min, permitió el acceso a una nueva serie de derivados acilfloroglucinoles **37a-j**. Este protocolo representa un método versátil y rápido para la preparación de este tipo de compuestos con buenos rendimientos (65-91%).
- Se prepararon dos nuevos floroglucinoles disustituídos, 2-metil-1-(2,4,6-trihidroxi-3-isopentilfenil)butan-1-ona **38a** y 2-metil-1-(2,4,6-trihidroxi-3-propilfenil)butan-1-ona **38b** con buenos rendimientos 85 y 96% respectivamente, por medio de una reacción de hidrogenólisis entre derivados acilfloroglucinoles **37** con $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ como catalizador.

- Se sintetizaron dos nuevos dibenzofuranos polioxigenados simétricos 1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxi-2,8-diisopentildibenzo[*b,d*]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona) **39a** y 1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxi-2,8-dipropildibenzo[*b,d*]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona) **39b** a partir de floroglucinol, mediante una secuencia de 7 pasos de reacción con un rendimiento global de 2 y 12% respectivamente.
- La actividad antimicrobiana frente a cepas resistentes de *S. aureus* de los floroglucinoles **38a-b**, **46** y los dibenzofuranos acil polioxigenados 39a-b, mostraron que todos los compuestos presentan actividad frente a bacterias Gram-positivas. Los compuestos **38a-b** y **46** son moderadamente activos y **39b** es muy activo en comparación al antibiótico vancomicina. El dibenzofurano **39b** presentó interesantes valores de inhibición (0.5 μ M) contra las cepas ATCC25923 y ATCC29212, siendo estos valores iguales a los obtenidos por el producto natural achyrofurano y en algunos casos más bajos a los obtenidos con oxaciclina (≤ 0.3 y 9.5 μ M) y vancomicina (0.7 y 1.4 μ M).

REFERENCIAS

1. Moloney, M. G., Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences* **2016**, 37 (8), 689-701.
2. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629-661.
3. Chen, Y.; Kops, C. d. B.; Kirchmair, J., Data Resources for the Computer-Guided Discovery of Bioactive Natural Products. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**.
4. Boudet, A.-M., Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **2007**, 68, 2722-2735.
5. Singh, I. P.; Bharate, S. B., Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 558-591.
6. Singh, I. P.; Sidana, J.; Bharate, S. B.; Foley, W. J., Phloroglucinol compounds of natural origin: Synthetic aspects. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 393-416.
7. Matkowski, A., Plant Phenolic Metabolites as Antioxidants and Mutagenesis Inhibitors. In *UV Radiation, Nitric Oxide and Cell Death in Plants*, NATO Life Science Monographs ed.; Y. Blume, P. S., & D. J. Durzan, Ed. IOS Press.: Amsterdam, 2006; Vol. 376.
8. Roleira, F. M. F.; Tavares-da-Silva, E. J.; Varela, C. L.; Costa, S. C.; Silva, T.; Garrido, J.; Borges, F., Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry* **2015**, 183, 235-258.
9. Valderrama-Eslava, E. I. M.-L. J.; Giraldo, C., Enforced herbivory on *Canavalia ensiformis* and *Tithonia diversifolia* and its effects on leaf-cutting ants, *Atta cephalotes*. *J. Appl. Entomol.* **2009**, 133, 689-694.
10. Castaño-Quintana, K.; Montoya-Lerma, J.; Giraldo-Echeverri, C., Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. *Industrial Crops and Products* **2013**, 44, 391-395.
11. Salud, O. M. d. I. Resistencia Antimicrobiana. Nota descriptiva Septiembre. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> (accessed 2017-09-15).
12. Salud, O. M. d. I. Resistencia a los antibioticos. Nota descriptiva. Octubre. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/> (accessed 2017-08-23).
13. Casero, C.; Machin, F.; Mendez-Alvarez, S.; Demo, M.; Ravelo, A. G.; Perez-Hernandez, N.; Joseph-Nathan, P.; Estevez-Braun, A., Structure and antimicrobial activity of phloroglucinol derivatives from *Achyrocline satureioides*. *J Nat Prod* **2015**, 78 (1), 93-102.
14. Shou, Q.; Banbury, L. K.; Renshaw, D. E.; Lambley, E. H.; Mon, H.; MacFarlane, G. a.; Griesser, H. J.; Heinrich, M. M.; Wohlmuth, H., Biologically active dibenzofurans from *Pilidiostigma glabrum*, an endemic Australian myrtaceae. *Journal of Natural Products* **2012**, 75 (9), 1612-1617.
15. Wommack, A. J.; Moebius, D. C.; Travis, A. L.; Kingsbury, J. S., Diverse alkanones by catalytic carbon insertion into the formyl C-H bond. Concise access to the natural precursor of achyrofuran. *Organic Letters* **2009**, 11 (15), 3202-3205.
16. War, A. R.; Paulraj, M. G.; Ahmad, T.; Buhroo, A. A.; Hussain, B.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H. C., Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav* **2012**, 7, 1306-1320.

17. Chagas-Paula, D.; Oliveira, R.; Rocha, B.; Da Costa, F., Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity* **2012**, *9*, 210-235.
18. Kennedy, D. O.; Wightman, E., Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function *Advances in Nutrition*. **2011**, *2* (1), 32-50.
19. Serna, F.; Correa, J., *Lycopersicon esculentum* tomato leaf extracts as phago-inhibitors of *Atta cephalotes* leaf-cutter ants. *Agronomía Colombiana* **2003**, *21* (3), 142-153.
20. Isenring, R.; Neumeister, L. *Recommendations regarding Derogations to use alpha-Cypermethrin, Deltamethrin, Fenitrothion, Fipronil and Sulfluramid in FSC Certified Forests in Brazil*; 2010.
21. Céspedes, C. L.; Aqueveque, P. M.; Avila, J. G.; Alarcon, J.; Kubo, I., New advances in chemical defenses of plants: researches in calceolariaceae. *Phytochemistry Reviews* **2015**, *14* (3), 367-380.
22. López, M. D.; Pascual-Villalobos, M. J., Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products* **2010**, *31*, 284-288.
23. Houghton, P. J.; Ren, Y.; Howes, M. J., Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi *Natural Product Reports* **2006**, *23*, 181-199.
24. Rattan, R. S., Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin *Crop Protection* **2010**, *29*, 913-920.
25. Politi, F. A.; Nascimento, J. D.; Silva, A. A.; Moro, I.; Garcia, M.; Guido, R. V.; Rodrigues, R. C.; Godinho, A. F.; Furlan, M., Insecticidal activity of an essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) on common bed bug *Cimex lectularis* L. and molecular docking of major compounds at the catalytic site of ClAChE1. *Parasitological Research* **2016**.
26. Da Silva, R.; Loeck, A.; De Magalhães, J. L. C.; Centenaro, E., Growth of symbiont fungi of cutter ants of the genus *Acromyrmex* in means of culture with different extracts. *Ciencia Rural* **2006**, *36* (3), 725-730.
27. Giraldo, C. Efecto del botón de oro *Tithonia diversifolia* sobre la herbivoría de hormiga arriera *Atta cephalotes* en una plantación de arboloco *Montanoa quad-rangularis*. 2005.
28. Rodríguez G., J.; Calle D., Z.; Montoya-Lerma, J., Herbivoría de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) sobre tres sustratos vegetales. *Revista Colombiana de Entomología* **2008**, *34* (2), 156-162.
29. Rodríguez, J.; Montoya-Lerma, J.; Calle, Z., Effect of *Tithonia diversifolia* Mulch on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) Nests. *Journal of Insect Science* **2015**, *15* (1), 32-32.
30. Abbas, O.; Compère, G.; Larondelle, Y.; Pompeu, D.; Rogez, H.; Baeten, V., Phenolic compound explorer: A mid-infrared spectroscopy database. *Vibrational Spectroscopy* **2017**, *92*, 111-118.
31. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed.; Oxford University Press.: 2007.
32. Halliwell, B., Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* **1995**, *49* (10), 1341-1348.
33. Slusarczyk, S.; Hajnos, M.; Skalicka-Wozniak, K.; Matkowski, A., Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 134-138.

34. Altıok, E.; Baycın, D.; Bayraktar, O.; Ulku, S., Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology* **2008**, *62*, 342-348.
35. Luthria, D. L.; Pastor-Corrales, M. A., Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 205-211.
36. Ross, K. A.; Beta, T.; Arntfield, S. D., A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 336-344.
37. Kuroda, M.; Yokosuka, A.; Kobayashi, R.; Jitsuno, M.; Kando, H.; Nosaka, K.; Ishii, H.; Yamori, T.; Mimaki, Y., Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **2007**, *55* (8), 1240-1244.
38. Zhao, G.; Li, X.; Chen, W.; Xi, Z.; Sun, L., Fitoterapia Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. *Fitoterapia* **2012**, *83* (8), 1590-1597.
39. Zhao, G.-j.; Xi, Z.-x.; Chen, W.-s.; Li, X.; Sun, L.; Sun, L.-n., Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* **2012**, *44*, 250-254.
40. Zhao, G.-j.; Xi, Z.-x.; Chen, W.-s.; Li, X.; Wang, Y., Two New Cerebrosides from the Aerial Parts of *Tithonia diversifolia*. **2012**, *95*, 1169-1174.
41. Li, X.; Huang, G.; Zhao, G.; Chen, W.; Li, J.; Sun, L., Two new monoterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. *Records of Natural Products* **2013**, *7* (4), 351-354.
42. Passoni, F. v. D.; Oliveira, R. B.; Chagas-Paula, D. A.; Gobbo-Neto, L.; Da Costa, F. B., Repeated-dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the toxic compounds. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *147*, 389-394.
43. Thongsom, M.; Chunglok, W.; Kuanchuea, R.; Tangpong, J., Antioxidant and hypoglycemic effects of *Tithonia diversifolia* aqueous leaves extract in alloxan-induced diabetic mice. *Advances in Environmental Biology* **2013**, *7* (9), 2116-2125.
44. Ambrosio, S. R.; Oki, Y.; Heleno, V. C.; Chaves, J. S.; Nascimento, P. G.; Lichston, J. E.; Constantino, M. G.; Varanda, E. M.; Da Costa, F. B., Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* **2008**, *69* (10), 2052-2060.
45. Miura, T.; Nosaka, K.; Ishii, H.; Ishida, T., Antidiabetic Effect of Nitobegiku, the Herb *Tithonia diversifolia*, in KK-Ay Diabetic Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28* (11), 2152-2154.
46. Goffin, E.; Ziemons, E.; De Mol, P.; De Madureira, M. d. C.; Martins, A. P.; Proenca da Cunha, A.; Philippe, G., In Vitro Antiplasmodial Activity of *Tithonia diversifolia* and Identification of its Main Active Constituent: Tagitinin C. *Planta Med* **2002**, *68*, 543-545.
47. Shyur, L.-F.; Tsung, J.-H.; Chen, J.-H.; Chiu, C.-Y.; Lo, C.-P., Antioxidant Properties of Extracts from Medicinal Plants Popularly Used in Taiwan. *International Journal of Applied Science and Engineering* **2005**, *3* (3), 195-202.
48. Kolawole, A. O.; Okonji, R. E.; Ajele, J. O., *Tithonia diversifolia*, *Cyperus rotundus* and *Hyptis suaveolens* ethanol extracts combinatorially and competitively inhibit affinity

- purified cowpea storage bruchid (*Callosobrochus maculatus*) glutathione S-transferase. *Arthropod-Plant Interactions* **2011**, *5*, 175-184.
49. Hiransai, P.; Tangpong, J.; Kumbuar, C.; Hoonheang, N.; Rodpech, O.; Sangsuk, P.; Kajklangdon, U.; Inkaow, W., Anti-nitric oxide production, anti-proliferation and antioxidant effects of the aqueous extract from *Tithonia diversifolia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2016**, *6* (11), 950-956.
 50. Miranda, M. A. F. M.; Varela, R. M.; Torres, A.; Molinillo, J. M. G.; Gualtieri, S. C. J.; Macías, F. A., Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1083-1092.
 51. Rios, C. I. *Botón de oro Tithonia diversifolia (Hemsl.) Gray en Arboles y arbustos forrajeros utilizados en alimentación animal como fuente proteica.*; CIPAV- Colciencias: Cali- Colombia, 1997; pp 115-126.
 52. Nash, D., Flora de Guatemala. In *Fieldiana: Botany*, Museum of Natural History, 1976; Vol. 24, pp 323-325.
 53. Baruah, N. C.; Sarma, J. C.; Barua, N. C.; Sarma, S.; Sharma, R. P., Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry* **1994**, *36* (1), 29-36.
 54. Kuo, Y. H.; Chen, C. H., Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Products* **1998**, *61* (6), 827-828.
 55. Lee, M. Y.; Liao, M. H.; Tsai, Y. N.; Chiu, K. H.; Wen, H. C., Identification and anti-human glioblastoma activity of tagitin C from *tithonia diversifolia* methanolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (6), 2347-2355.
 56. Scotti, M. T.; Emerenciano, V.; Scotti, L.; Stefani, R.; Da Silva, M. S.; Mendonça Junior, F. J., *Molecules* **2012**, *17*, 4684-4702.
 57. Ambrósio, S. R.; Oki, Y.; Heleno, V. C. G.; Chaves, J. S.; Nascimento, P. G. B. D.; Lichston, J. E.; Constantino, M. G.; Varanda, E. M.; Da Costa, F. B., Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. *Phytochemistry* **2008**, *69* (10), 2052-2060.
 58. Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Menichini, F.; Menichini, F., Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders: an update. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15* (12), 1209-1228.
 59. Bouberte, M. Y.; Krohn, K.; Hussain, H.; Dongo, E.; Schulz, B.; Hu, Q., Tithoniaquinone A and tithoniamide B: A new anthraquinone and a new ceramide from leaves of *Tithonia diversifolia*. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences* **2006**, *61* (1), 78-82.
 60. Ragasa, C. Y.; Tempora, M. M.; Rideout, J. a., Terpenoids from *Tithonia diversifolia*. *Journal of Research in Science, Computing and Engineering* **2008**, *4* (1).
 61. Eigenbrode, S. D., Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. *Annual Review of Entomology* **1995**, *40* (1), 171-194.
 62. Terrance, H. D.; Wiemer, D. F., Ant-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry* **1985**, *24* (6), 1197-1198.
 63. Okunade, A. L.; Wiemer, D. F., Ant-repellent sesquiterpene lactones from *Eupatorium quadrangulae*. *Phytochemistry* **1985**, *24* (6), 1199-1201.
 64. Oyedokun, a. V.; Anikwe, J. C.; Okelana, F. a.; Mokuwunye, I. U.; Azeez, O. M., Pesticidal efficacy of three tropical herbal plants' leaf extracts against *Macrotermes bellicosus*, an emerging pest of cocoa, *Theobroma cacao* L. *Journal of Biopesticides* **2011**, *4* (2), 131-137.

65. Adedire, C. O.; Akinneye, J. O., Biological activity of tree marigold, *Tithonia diversifolia*, on cowpea seed bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Annals of Applied Biology* **2004**, *144* (2), 185-189.
66. Oyewole, I. O.; Adeoye, G. O.; Anyasor, G.; Obansa, J. a., Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl .) leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* **2008**, *2* (8), 171-175.
67. Dai, D. N.; Thang, T. D.; Ogunmoye, A.; Eresanya, O. I.; Ogunwande, I. A., Chemical constituents of essential oils from the leaves of *Tithonia diversifolia*, *Houttuynia cordata* and *Asarum glabrum* grown in Vietnam. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* **2015**, *2* (4), 17-21.
68. Nerio, L. S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E., Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* **2010**, *101* (1), 372-378.
69. Gillij, Y. G.; Gleiser, R. M.; Zygadlo, J. a., Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* **2008**, *99* (7), 2507-2515.
70. Céspedes, C. L.; Alarcon, J. E.; Aqueveque, P.; Seigler, D. S.; Kubo, I., In the search for new secondary metabolites with biopesticidal properties. *Israel Journal of Plant Sciences* **2015**, (August), 1-13.
71. Ryan, M. F.; Byrne, O., Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology* **1988**, *14* (10), 1965-1975.
72. Radic, Z.; Pickering, N. a.; Vellom, D. C.; Camp, S.; Taylor, P., Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* **1993**, *32* (45), 12074-12084.
73. Céspedes, C. L.; Muñoz, E.; Salazar, J. R.; Yamaguchi, L.; Werner, E.; Alarcon, J.; Kubo, I., Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from *Calceolaria talcana* and *C. integrifolia* (Calceolariaceae: Scrophulariaceae). *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *62*, 919-926.
74. Fournier, D.; Bride, J. M.; F, H.; Karch, F., Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. **1992**, *267* (20), 14270-14274.
75. Miyazawa, M.; Watanabe, H.; Kameoka, H., Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a p -Menthane Skeleton. *J Agri Food Chem* **1997**, (45), 677-679.
76. Céspedes, C. L.; Avila, J. G.; Marin, J. C.; Domínguez L, M.; Torres, P.; Aranda, E., Naturally Occurring Bioactive Compounds. *Advances in Phytomedicine* **2006**, *3*, 1-27.
77. Céspedes, C. L.; Salazar, J. R.; Ariza-Castolo, A.; Yamaguchi, L.; Ávila, J. G.; Aqueveque, P.; Kubo, I.; Alarcón, J., Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environmental Research* **2014**, *132*, 391-406.
78. Uriburu, M. L.; Gil, R. R.; Sosac, V. E.; De La Fuente, J. R., Caffeoylesteres of threonic acid and its lactone from *Viguera Pazensis*. *Journal Argentine Chem* **2008**, *96*, 55-61.
79. Torres, H. G. Elucidación estructural y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Siparuna gigantotepala*, Renner & Hausner. Universidad del Valle, Cali, 2016.
80. Zhao, G. J.; Xia, Z. X.; Chen, W. S.; Lib, X.; Sunc, L.; Sun, L. N., Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* **2012**, *44*, 250-254.

81. Pantoja Pulido, K. D.; Dulcey, A. J. C.; Isaza Martínez, J. H. I., New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology* **2017**.
82. Iupac; Iupac, I., Nomenclature of cyclitols. *Biochemical Journal* **1976**, *153*, 23-31.
83. Pauli, G. F.; Poetsch, F.; Nahrstedt, a., Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Anal* **1998**, *9* (June 1997), 177-185.
84. Tatefuji, T.; Izumi, N.; Ohto, T.; Arai, S.; Ikeda, M.; Kurimoto, M., Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis which Enhance Macrophage Spreading and Mobility. *Bioscienci Biotechnology Biochemistry* **1996**, *19* (7), 966-970.
85. Wang, Y.; Liu, B., Preparative isolation and purification of dicaffeoylquinic acids from the *Ainsliaea fragrans* champ by high-speed counter-current chromatography. *Phytochemical Analysis* **2007**, *18* (5), 436-440.
86. Zhao, J. G.; Yan, Q. Q.; Xue, R. Y.; Zhang, J.; Zhang, Y. Q., Isolation and identification of colourless caffeoyl compounds in purple sweet potato by HPLC-DAD-ESI/MS and their antioxidant activities. *Food Chemistry* **2014**, *161*, 22-26.
87. Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N., Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2900–2911.
88. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P., Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian *Arnica Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1193-1204.
89. Nakatani, N.; Kayano, S.-i.; Kikuzaki, H.; Sumino, K.; Katagiri, K.; Mitani, T., Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (*Prunus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5512-5516.
90. Clifford, M. N.; Knight, S.; Kuhnert, N., Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS(n). *J Agric Food Chem.* **2005**, *18* (53), 3821-3832.
91. Cao, J.; Jiang, Q.; Lin, J.; Li, X.; Sun, C.; Chen, K., Physicochemical characterisation of four cherry species (*Prunus* spp.) grown in China. *Food Chemistry* **2015**, *173*, 855-863.
92. Hung, T. M.; Na, M.; Thuong, P. T.; Su, N. D.; Sok, D.; Song, K. S.; Seong, Y. H.; Bae, K., Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 188-192.
93. Jianga, X.-W.; Bai, J.-P.; Zhang, Q.; Hu, X.-L.; Tian, X.; Zhu, J.; Liu, J.; Meng, W.-H.; Zhao, Q.-C., Caffeoylquinic acid derivatives from the roots of *Arctium lappa* L. (burdock) and their structure–activity relationships (SARs) of free radical scavenging activities. *Phytochemistry Letters* **2016**, *15*, 159-163.
94. Shi, J.; Gong, J.; Liu, J. e.; Wu, X.; Zhang, Y., Antioxidant capacity of extract from edible flowers of *Prunus mume* in China and its active components. *LWT - Food Science and Technology* **2009**, *42*, 477-482.
95. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1841-1856.
96. Bueno, F. C.; Godoy, M. P.; Leite, A. C.; Bueno, O. C.; Pagnocca, F. C.; Fernandez, J. B.; Hebling, M. J. A.; Bacci, M.; Vieira, P. C.; Silva, M. F. G. F., Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. *Sociobiology* **2005**, *45* (2), 389-399.

97. Bilder, C. R.; Loughin, T. M., *Analysis of Categorical Data with R*. Taylor & F ed.; 2015; p 547-547.
98. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Jr, V.; Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, 7 (2), 88-95.
99. Sdiri, S.; Bermejo, A.; Aleza, P.; Navarro, P.; Salvador, A., Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Research International* **2012**, 49 (1), 462-468.
100. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. **1996**, 76, 70-76.
101. Van Hoek, A. A. M.; Mevius, D.; Guerra, B.; Mullany, P.; Roberts, A.; Aarts, H. J. M., Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology* **2011**, 2, 203.
102. Magnet, S.; Blanchard, J. S., Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 477-497.
103. McDermott, P. F.; Walker, R. D.; White, D. G., Antimicrobials: Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *International Journal of Toxicology* **2003**, 22, 135-143.
104. Salud, O. M. d. l. ¿Que es la resistencia a los antimicrobianos? Nota descriptiva. Julio. <http://www.who.int/features/qa/75/es/>.
105. MARAN *Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands In 2005*; 2005.
106. NethMap *Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands in 2016*; 2017.
107. Tong, S. Y. C.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G. J., Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* **2015**, 28 (3), 603-661.
108. De Lencastre, H.; Oliveira, D.; Tomas, A., Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol* **2007**, 10 (5), 428-435.
109. Gardete, S.; Tomas, A., Mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *J Clin Invest.* 2836–2840. **2014**, 124 (7), 2836–2840.
110. Afroz, S. N.; Kobayashi, S.; Nagashima, M. M.; Alam, A. B.; Hossain, M. A.; Rahman, M. R.; Islam, A. B.; Lutfur, N.; Muazzam, M. A.; Khan, S. K.; Paul, A. K.; Shamsuzzaman, M. C.; Mahmud, A. K., Genetic characterization of Staphylococcus aureus isolates carrying Panton Valentine Leukocidin genes in Bangladesh. *Jpn. J. Infects. Dis.* **2008**, 61 (9), 486-493.
111. Hiramatsu, K.; Cui, L.; Kuroda, M.; Ito, T., The emergence and evolution of methicillin resistant Staphylococcus aureus. *Trends. Microbiol* **2001**, 9 (486-493).
112. Saleem, M.; Nazir, M.; Shaiq Ali, M.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A., Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 238-254.
113. Mishra, B. B.; Tiwari, V. K., Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 4769-4807.
114. Casero, C.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Demo, M.; Mendez-Alvarez, S.; Machin, F., Achyrofurin is an antibacterial agent capable of killing methicillin-resistant vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in the nanomolar range. *Phytomedicine* **2013**, 20 (2), 133-8.

115. Ravelo, A. G.; Estévez-Braun, A.; Machín-Concepción, F. M.; Méndez-Álvarez, S.; Demo, M. S.; Casero, C. Prenylated Polyketide Derivatives as Potential Antibacterial Agents for Treatment of Drug-resistant Infection Diseases. 2012.
116. Retta, D.; Dellacassa, E.; Villamil, J.; Suárez, S. a.; Bandoni, A. L., Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products* **2012**, *38* (1), 27-38.
117. Baldissera, M. D.; Oliveira, C. B.; Zimmermann, C. E. P.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Bolzan, L. P.; Vaucher, R. D. A.; Santurio, J. M.; Sagrillo, M. R., In Vitro Trypanocidal Activity of Macela (*Achyrocline satureioides*) Extracts against *Trypanosoma evansi*. *Korean J Parasitol* **2014**, *52* (3), 311-315.
118. Heinzen, H.; Vázquez, A.; Dellacassa, E., *Especies relevantes para una propuesta de cadena productiva para encarar la producción y comercialización de productos fitofarmacéuticos en Uruguay*. Montevideo, Uruguay, 2005; p 1-38.
119. Morton, J. F., No Title. *Q. J. Crude Drug Res.* **1975**, *13*, 97-121.
120. Ratera, E. L.; Ratera, M. O., *Plantas de la Flora Argentina empleadas en la medicina popular Hemisferio Sur, Buenos Aires*. 1980; p 81-81.
121. Toursarkissian, M., *Plantas Medicinales de la Argentina Hemisferio Sur, Buenos Aires*. 1980; p 25-25.
122. Filot Da Silva, L.; Langeloh, A., Estudio comparativo de la actividad antiespasmódica de extractos hidroalcohólicos al 80% (v/v) de extractos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) con papaverina y atropina sobre yeyuno aislado de rata. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **1994**, *13* (1), 35-40.
123. Gillij, Y. G.; Gleiser, R. M.; Zygadlo, J. A., Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* **2008**, *99*, 2507-2515.
124. Hnatyszyn, O.; Moscatelli, V.; Rondina, R.; Costa, M.; Arranz, C.; Balaszczuk, A.; Coussio, J.; Ferraro, G., Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 366-369.
125. Lorenzi, H.; Matos, F., *Plantas medicinais no Brasil: nativas y exóticas cultivadas*. 2002; p 131-131.
126. Ferraro, G.; Anesini, C.; Ouvina, A.; Retta, D.; Filip, R.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Hnatyszyn, O.; Bandoni, A., Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina. *Latin American Journal of Pharmacy* **2008**, *27* (4), 626-628.
127. De Souza, K. C. B.; Bassani, V. L.; Schapoval, E. E. S., Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 102-108.
128. Cosentino, M.; Bombelli, R.; Carcano, E.; Luini, A.; Marino, F.; Crema, F.; Dajas, F.; Lecchini, S., Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, *116*, 501-507.
129. Bettega, J. M. R.; Teixeira, H.; Bassani, V. L.; Barardi, C. R. M.; Simões, C. M. O., Evaluation of the Antiherpetic Activity of Standardized Extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 819-823.
130. Simões, C.; Schenkel, E.; Bauer, L.; Langeloh, A., Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., Compositae. *J Ethnopharmacol.* **1988**, *22* (3), 281-293.

131. Carini, J. P.; Klamt, F.; Bassani, V. L., Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Adv.* **2014**, *4* (7), 3131-3144.
132. Reinecke, M. G.; Minter, D. E.; Jia, Q., Carbon and Proton NMR Assignments for 6,7-Dimethoxycoumarin. *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 757-758.
133. Puhlmann, J.; Knaus, U.; Tubaro, L.; Schaffer, W.; Wagner, H., Immunologically active metalcion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2617-2621.
134. Dembitsky, V. M.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G., Natural Halogenated Polyacetylenides. *Chemistry for Sustainable Development* **2003**, *11*, 341-348.
135. Carney, J. R.; Krenisky, J. M.; Williamson, R. T.; Luo, J., Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of Natural Products* **2002**, *65* (2), 203-205.
136. Heng, S.; Harris, K. M.; Kantrowitz, E. R., Designing inhibitors against fructose 1,6-bisphosphatase: Exploring natural products for novel inhibitor scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 1478-1484.
137. Joray, M. B.; Rollán, M. d. R.; Ruiz, G. M.; Palacios, S. M.; Carpinella, M. C., Antibacterial Activity of Extracts from Plants of Central Argentina—Isolation of an Active Principle from *Achyrocline satureioides*. *Planta Med* **2011**, *77*, 95-100.
138. Nakayama, R.; Murata, M.; Homma, S.; Aida, K., Antibacterial compounds from *Eucalyptus perriniana*. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54* (1), 231-232.
139. Isnansetyo, A.; Cui, L.; Hiramatsu, K.; Kamei, Y., Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2003**, *22*, 545-547.
140. Isnansetyo, A.; Horikawa, M.; Kamei, Y., In vitro anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2001**, *47*, 724-725.
141. Mathekga, A. D. M.; Meyer, J. J. M.; Horn, M. M.; Drewes, S. E., An acylated phloroglucinol with antimicrobial properties from *Helichrysum caespititum*. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 93-96.
142. Van der Schyf, C. J.; Dekker, T. G.; Fourie, T. G.; Snyckers, F. O., Synthesis and Antimicrobial Activity of a Series of Caespitin Derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *30* (3), 375-381.
143. Yamaki, M.; Miwa, I.; Ishiguro, K.; Takagi, S., Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinols against *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research* **1994**, *8* (2), 112-114.
144. Kaniwa, K.; Ohtsuki, T.; Yamamoto, Y.; Ishibashi, M., Kehokorins A-C, novel cytotoxic dibenzofurans isolated from the myxomycete *Trichia favoginea* var. *persimilis*. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47* (10), 1505-1508.
145. Watanabe, K.; Ohtsuki, T.; Yamamoto, Y.; Ishibashi, M., New Kehokorins and Trichiols from the Myxomycete *Trichia favoginea*. *Heterocycles* **2007**, *71* (8), 1807-1814.
146. Sawada, T.; Aono, M.; Asakawa, S.; Ito, A.; Awano, K., Structure determination and total synthesis of a novel antibacterial substance, AB0022A, produced by a cellular slime mold. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* **2000**, *53* (9), 959-966.

147. Setzer, W. N.; Rozmus, G. F.; Setzer, M. C.; Schmidt, J. M.; Vogler, B.; Reeb, S.; Jackes, B. R.; Irvine, A. K., Bioactive principles in the bark of *Pilidiostigma tropicum*. *Journal of Molecular Modeling* **2006**, *12* (5), 703-711.
148. Shum, D.; Radu, C.; Kim, E.; Cajuste, M.; Shao, Y.; Seshan, V.; Djaballah, H., A high density assay format for the detection of novel cytotoxic agents in large chemical libraries. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2008**, *23* (6), 931-945.
149. Xie, C.; Koshino, H.; Esumi, Y.; Onose, J.-i.; Yoshikawa, K.; Abe, N., Vialinin B, a novel potent inhibitor of TNF- α production, isolated from an edible mushroom, *Thelephora vialis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, *16* (20), 5424-5426.
150. Liu, J.-k.; Hu, L.; Dong, Z.-j.; Hu, Q., DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural p-Terphenyl Derivatives Obtained from Three Edible Mushrooms Indigenous to China. *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 8-12.
151. Müller, K., Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *56* (1-2), 9-16.
152. Lauterwein, M.; Oethinger, M.; Belsner, K.; Peters, T.; Marre, R., In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (+)-Usnic Acid, and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1995**, *39* (11), 2541-2543.
153. Wossa, S. W.; Beekman, A. M.; Ma, P.; Kevo, O.; Barrow, R. A., Identification of Boletopsis 11 and 12, Antibiotics from the Traditionally Used Fungus *Boletopsis* sp. *Asian Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2*, 565-567.
154. Sargent, M. V.; Stransky, P.; Patrick, V. A.; White, A. H., ' On the Structures of the R hodomyrtotoxins. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1983**, *1*, 231-239.
155. Love, B. E., Isolation and synthesis of polyoxygenated dibenzofurans possessing biological activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *97*, 377-387.
156. Heng, S.; Harris, K. M.; Kantrowitz, E. R., Designing inhibitors against fructose 1,6-bisphosphatase: Exploring natural products for novel inhibitor scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45* (4), 1478-1484.
157. Chow, H.-F.; Wang, Z.-Y.; Lau, Y.-F., An Accelerated, Improved Synthetic Route for the Preparation of Polyether-based Dendritic Fragments. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13813-13824.
158. Bazin, M.-A.; Boderio, L.; Tomasoni, C.; Rousseau, B.; Roussakis, C.; Marchand, P., Synthesis and antiproliferative activity of benzofuran-based analogs of cercosporamide against non-small cell lung cancer cell lines. *European journal of medicinal chemistry* **2013**, *69*, 823-832.
159. Haines, A. H.; Hughes, D. L., Benzene-1,3,5-triyl triacetate. *Acta Crystallographica* **2009**, *E65*, o3279.
160. Deme, E., Synthesis of authentic tri-O-benzylphloroglucinol. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (23), 3769-3769.
161. Paul, S.; Nanda, P.; Gupta, R.; Loupy, A., Zinc Mediated Friedel-Crafts Acylation in Solvent-Free Conditions under Microwave Irradiation. *Synthesis* **2003**, *18*, 2877-2881.
162. Jang, D. O.; Moon, K. S.; Cho, D. H.; Kim, J.-G., Highly selective catalytic Friedel-Crafts acylation and sulfonylation of activated aromatic compounds using indium metal. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 6063-6066.
163. Tarascou, I.; Barathieu, K.; André, Y.; Pianet, I.; Dufourc, E. J.; Fouquet, E., An Improved Synthesis of Procyanidin Dimers: Regio- and Stereocontrol of the Interflavan Bond. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *23*, 5367-5377.

164. Castanet, A.-S.; Colobert, F.; Broutin, P.-E., Mild and regioselective iodination of electron-rich aromatics with N-iodosuccinimide and catalytic trifluoroacetic acid. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 5047-5048.
165. Odejinmi, S. I.; Wiemer, D. F., Application of benzyl protecting groups in the synthesis of prenylated aromatic compounds. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 3871-3874.
166. Nair, V.; Deepthi, A., Recent advances in CAN mediated reactions in organic synthesis. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 10745-10755.
167. Fujioka, H.; Hirose, H.; Ohba, Y.; Murai, K.; Nakahara, K.; Kita, Y., Cerium ammonium nitrate (CAN) for mild and efficient reagent to remove hydroxyethyl units from 2-hydroxyethyl ethers and 2-hydroxyethyl amines. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 625-637.
168. Rodebaugh, R. D., J. S. / Fraser-Reid, B., Debenzylation of complex oligosaccharides using ferric chloride. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37* (31), 5477-5478.
169. Dwight, T. A.; Rue, N. R.; Charyk, D.; Josselyn, R.; DeBoef, B., C–C Bond Formation via Double C–H Functionalization: Aerobic Oxidative Coupling as a Method for Synthesizing Heterocoupled Biaryls. *Organic Letters* **2007**, *9* (16), 3137-3139.
170. Guo, W.; Faggi, E.; Sebastián, R. M.; Vallribera, A.; Pleixats, R.; Shafir, A., Direct Arylation of Oligonaphthalenes Using PIFA/BF₃·Et₂O: From Double Arylation to Larger Oligoarene Products. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8169-8175.
171. Keinan, E.; Mazur, Y., Reactions in dry media. Ferric chloride adsorbed on silica gel. A multipurpose, easily controllable reagent. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (5), 1020-1022.
172. Oramas-Royo, S.; Pantoja, K. D.; Amesty, Á.; Romero, C.; Lorenzo-Castrillejo, I.; Machín, F.; Estévez-Braun, A., Synthesis and Antibacterial Activity of New Symmetric Polyoxygenated Dibenzofurans. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *141*, 178-187.
173. Coulson, D. R.; Satek, L. C.; Grim, S. O., Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0). *Inorganic Synthesis* **1972**, *13*, 121-121.
174. Haines, A. H.; Hughes, D. L., No Title. *Acta Crystallographica E65* **2009**, o3279-o3279.
175. Chow, H. F.; Wang, Z. Y.; Lau, Y. F., An accelerated, improved synthetic route for the preparation of polyether-based dendritic fragments. *Tetrahedron* **1998**, *54* (45), 13813-13824.
176. Sun, Q.; Schmidt, S.; Tremmel, M.; Heilmann, J.; König, B., Synthesis of natural-like acylphloroglucinols with anti-proliferative, anti-oxidative and tube-formation inhibitory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *85*, 621-628.
177. CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard*. 8 ed.; Wayne, PA.: 2008; p Wayne, PA.
178. Molenberghs, G.; Verbeke, G., *Models for Discrete Longitudinal Data*. Springer S ed.; 2005; p 683-683.

ANEXOS

CAPITULO 1. ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE HOJAS DE *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

A menudo se asume, de forma muy razonable, que el error no explicado tiene la propiedad de seguir una distribución Normal con varianza homogénea. Sin embargo, puede suceder que la variable objetivo no sea continua, o ni siquiera cuantitativa. De esta manera los errores no pueden ser Normales. Esta generalización da lugar a los modelos lineales generalizados (GLM) que pueden emplearse en situaciones donde la variable respuesta de interés es binaria (vivo/muerto), proporcional (porcentaje de mortalidad) o de conteo (número de sujetos que presentan cierto evento).

Otra posible generalización consiste en reducir restricciones sobre los errores manteniendo sin embargo la propiedad de Normalidad, es decir, contemplando errores no independientes que se pueden obtener al observar un sujeto repetidamente en el tiempo dando origen a una estructura de correlación entre las respuestas de un mismo sujeto. Esta generalización, que permite dotar de estructura a la dependencia de los errores del modelo, da lugar a los modelos lineales mixtos (MIXED), los cuales incorporan tanto factores de interés fijos (Tratamientos) como factores aleatorios (por ejemplo: medidas en el tiempo).

Los modelos lineales generalizados y los modelos mixtos pueden ser fusionados dando lugar a los modelos lineales mixtos generalizados (GLMM), los cuales constituyen una combinación natural de dos líneas de modelación¹⁷⁸.

Tabla 1.1 Análisis de devianza en el experimento de ingestión con DMSO y CMC.

Respuesta: Mortalidad en hormigas			
Factor	Estadístico Chi-Cuadrado	Grados de Libertad	Valor-p
Sustancia	155.28	5	<2.2E-16
Día	717.49	13	<2.2E-16

Tabla 1.2 Pruebas de comparación múltiple en el experimento de ingestión con DMSO y CMC.

Comparación	Odds ratio - OR		
	Estimado	Intervalo de Confianza al 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
CMC 0.25% vs Control	0.68	0.25	1.86
CMC 0.5% vs Control	2.33	0.85	6.38
DMSO 0.5% vs Control	1.80	0.65	4.94
DMSO 1% vs Control	8.29	2.97	23.15
DMSO 3% vs Control	45.76	15.03	139.33
CMC 0.5% vs CMC 0.25%	3.44	1.26	9.40
DMSO 0.5% vs CMC 0.25%	2.65	0.96	7.26
DMSO 1% vs CMC 0.25%	12.22	4.38	34.07
DMSO 3% vs CMC 0.25%	67.43	22.17	205.16
DMSO 0.5% vs CMC 0.5%	0.77	0.28	2.11
DMSO 1% vs CMC 0.5%	3.55	1.28	9.87
DMSO 3% vs CMC 0.5%	19.61	6.49	59.23
DMSO 1% vs DMSO 0.5%	4.62	1.65	12.89
DMSO 3% vs DMSO 0.5%	25.47	8.37	77.50
DMSO 3% vs DMSO 1%	5.52	1.81	16.83

Tabla 2.1 Análisis de devianza en el experimento de contacto con DMSO y CMC.

Respuesta: Mortalidad en hormigas			
Factor	Estadístico	Grados de	Valor-p
	Chi-Cuadrado	Libertad	
Sustancia	70.039	5	1.006E-13
Día	363.220	13	<2.2E-16

Tabla 2.2 Pruebas de comparación múltiple en el experimento de contacto con DMSO y CMC.

Comparación	Odds ratio - OR		
	Estimado	Intervalo de Confianza al 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
CMC 0.125% vs Control	3.97	0.64	24.59
CMC 0.25% vs Control	1.51	0.23	9.89
DMSO 0.5% vs Control	21.24	3.47	130.13
DMSO 1% vs Control	17.29	2.75	108.58
DMSO 3% vs Control	85.63	13.47	544.34
CMC 0.25% vs CMC 0.125%	0.38	0.06	2.34
DMSO 0.5% vs CMC 0.125%	5.35	0.94	30.53
DMSO 1% vs CMC 0.125%	4.36	0.74	25.53
DMSO 3% vs CMC 0.125%	21.59	3.66	127.40
DMSO 0.5% vs CMC 0.25%	14.03	2.31	85.05
DMSO 1% vs CMC 0.25%	11.42	1.84	70.97
DMSO 3% vs CMC 0.25%	56.57	9.00	355.65
DMSO 1% vs DMSO 0.5%	0.81	0.14	4.67
DMSO 3% vs DMSO 0.5%	4.03	0.71	22.96

DMSO 3% vs DMSO 1%	4.95	0.84	29.22
--------------------	------	------	-------

Tabla 3.1 Análisis de devianza en el experimento de ingestión con extractos de *T. diversifolia* a 1000 ppm.

Respuesta: Mortalidad en hormigas			
Factor	Estadístico	Grados de	Valor-p
	Chi-Cuadrado	Libertad	
Extracto	26.011	5	8.882E-05
Día	361.968	13	<2.2E-16

Tabla 3.2 Pruebas de comparación múltiple en el experimento de ingestión con extractos de *T. diversifolia* a 1000 ppm.

Comparación	Odds ratio - OR		
	Estimado	Intervalo de Confianza al 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
Hexano vs Control	1.31	0.42	4.07
Metanol vs Control	0.99	0.31	3.16
Diclorometano vs Control	3.82	1.04	14.07
Acuoso vs Control	0.74	0.23	2.39
CMC 0.166% vs Control	0.42	0.14	1.28
Metanol vs Hexano	0.75	0.24	2.35
Diclorometano vs Hexano	2.92	0.82	10.39
Acuoso vs Hexano	0.57	0.17	1.91
CMC 0.166% vs Hexano	0.32	0.10	1.00
Diclorometano vs Metanol	3.88	1.19	12.66

Acuoso vs Metanol	0.75	0.24	2.33
CMC 0.166% vs Metanol	0.43	0.14	1.33
Acuoso vs Diclorometano	0.19	0.06	0.68
CMC 0.166% vs Diclorometano	0.11	0.03	0.41
Acuoso vs CMC 0.166%	0.57	0.18	1.82

Tabla 4.1 Análisis de devianza en el experimento de contacto con extractos de *T. diversifolia* a 1000 ppm.

Respuesta: Mortalidad en hormigas			
Factor	Estadístico	Grados de	Valor-p
	Chi-Cuadrado	Libertad	
Extracto	26.606	5	0.000166
Día	579.308	13	<2.2E-16

Tabla 4.2. Pruebas de comparación múltiple en el experimento de contacto con extractos de *T. diversifolia* a 1000 ppm.

Comparación	Odds ratio - OR		
	Estimado	Intervalo de Confianza al 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
Hexano vs Control	0.68	0.26	1.76
Metanol vs Control	0.66	0.25	1.72
Diclorometano vs Control	0.38	0.15	0.91
Acuoso vs Control	0.24	0.10	0.59

CMC 0.166% vs Control	0.54	0.21	1.36
Metanol vs Hexano	0.98	0.35	2.74
Diclorometano vs Hexano	0.55	0.19	1.65
Acuoso vs Hexano	0.35	0.12	1.01
CMC 0.166% vs Hexano	0.79	0.27	2.32
Diclorometano vs Metanol	0.57	0.19	1.71
Acuoso vs Metanol	0.36	0.13	1.03
CMC 0.166% vs Metanol	0.81	0.28	2.37
Acuoso vs Diclorometano	0.63	0.22	1.81
CMC 0.166% vs Diclorometano	1.43	0.50	4.12
CMC 0.166% vs Acuoso	2.26	0.78	6.53

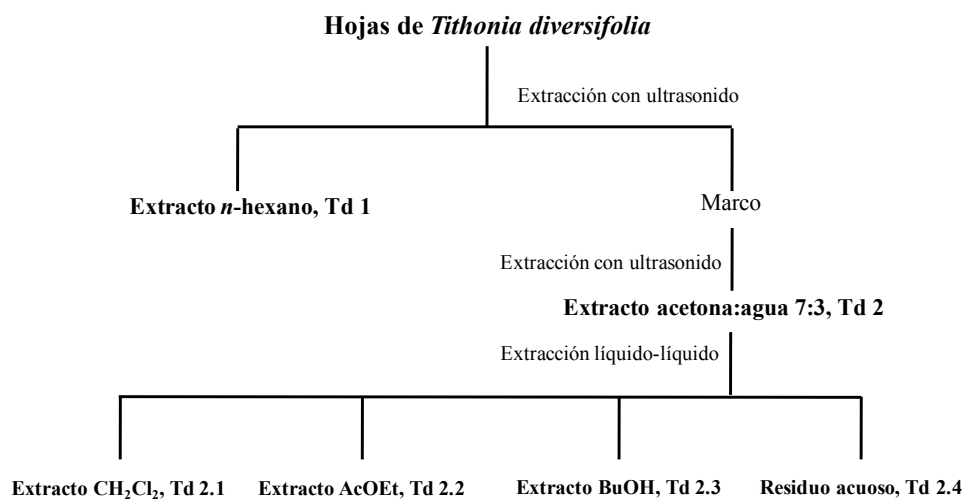


Figura 1. Metodología empleada para la obtención de extractos de *Tithonia diversifolia*.

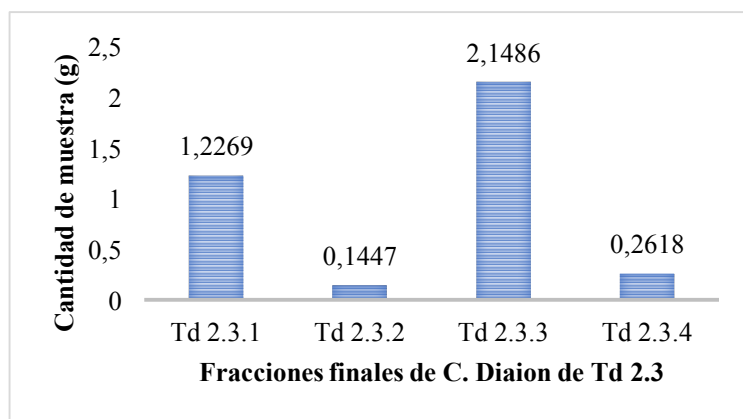


Figura 2. Masas obtenidas de las fracciones Td 2.3.

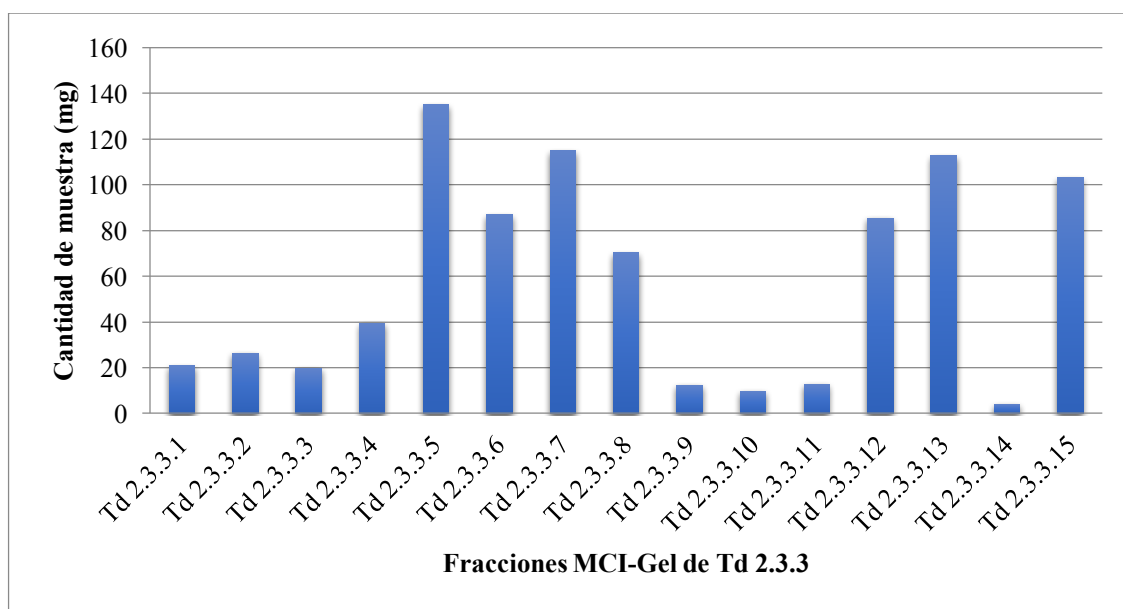


Figura 3. Masas obtenidas de las fracciones Td 2.3.3.

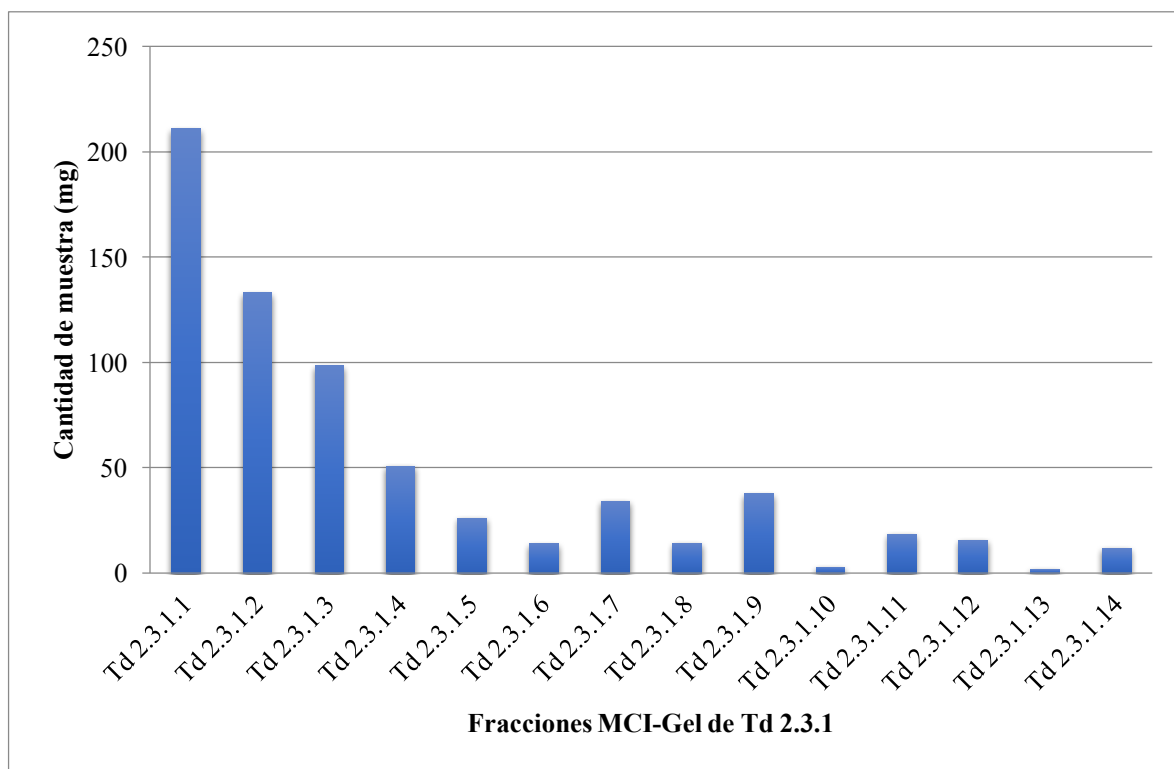
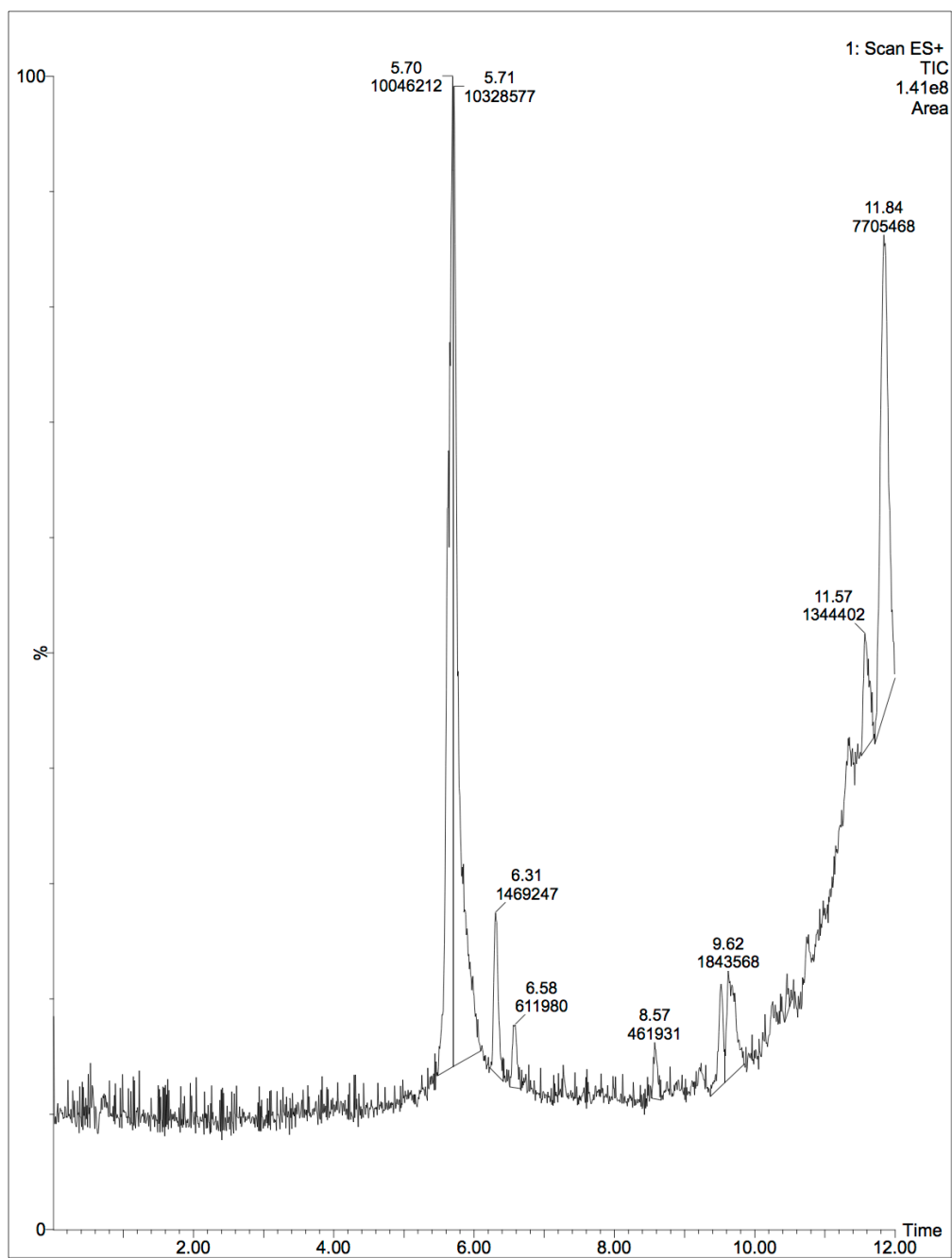
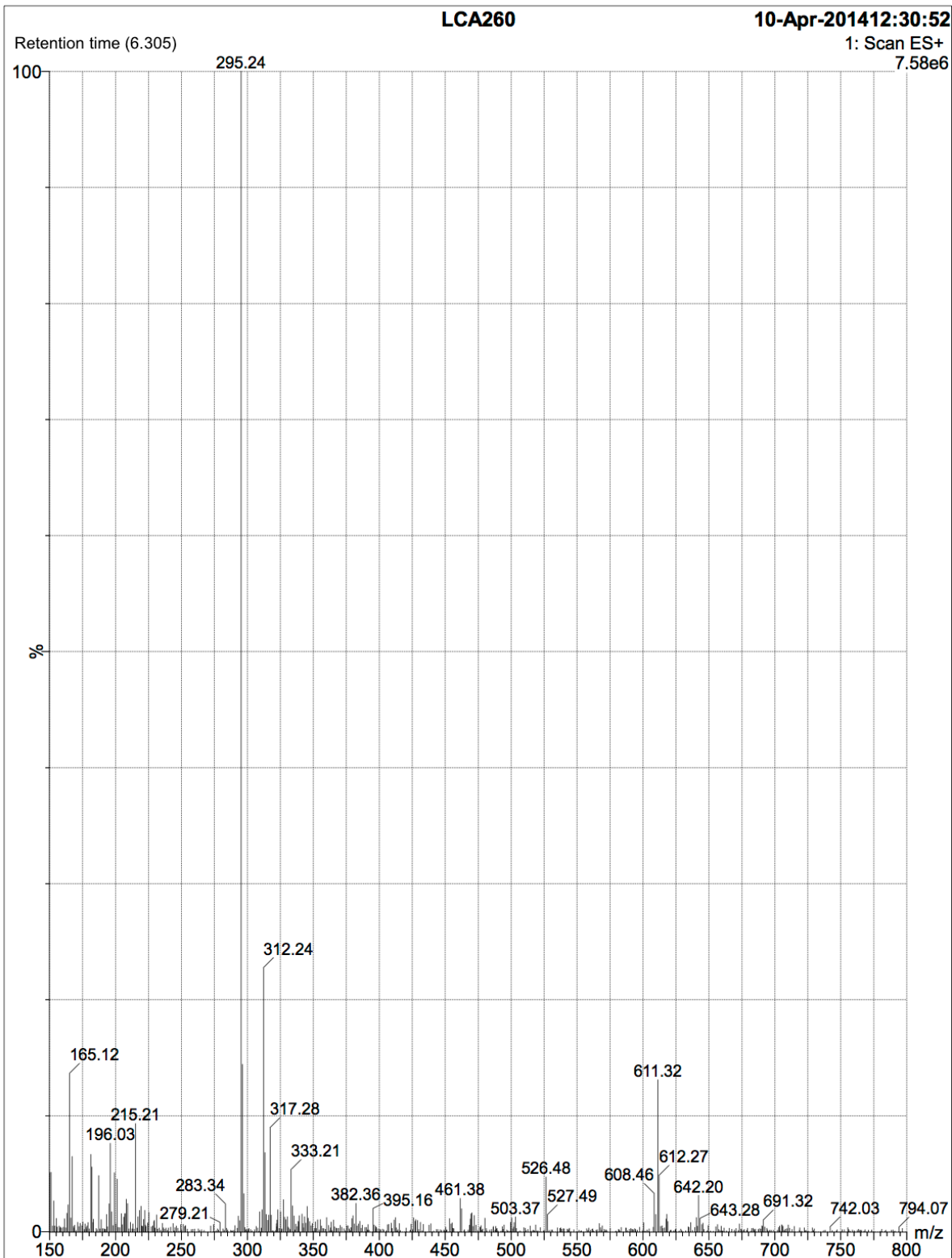
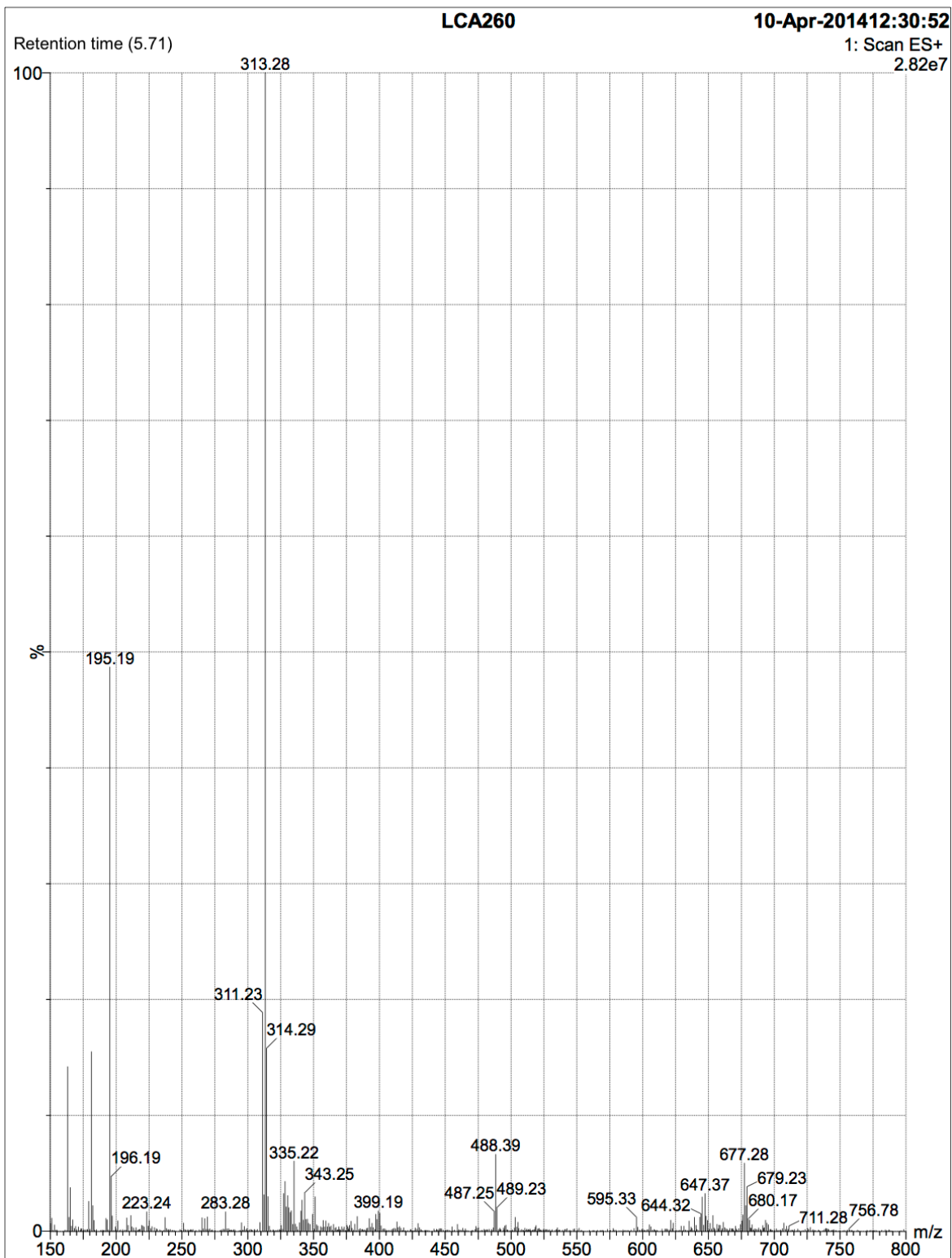


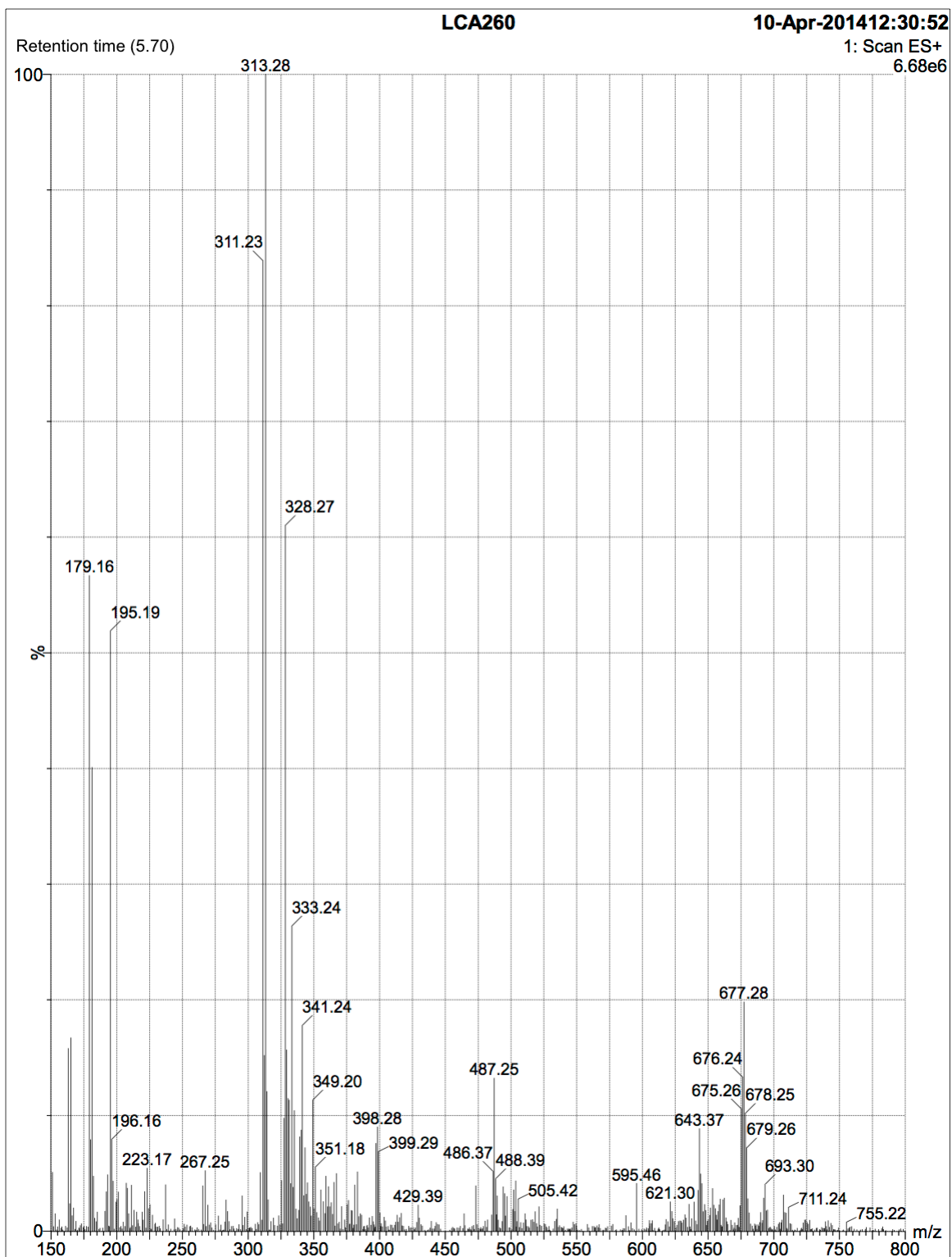
Figura 4. Masas obtenidas de las fracciones Td 2.3.1.

HPLC-MS en modo positivo del compuesto 1









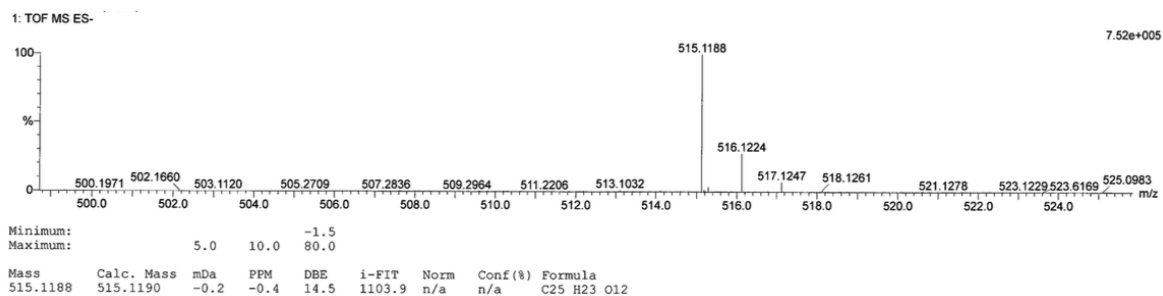


Figura 5. Espectros de HR-ESI-MS en modo negativo del compuesto **4**.

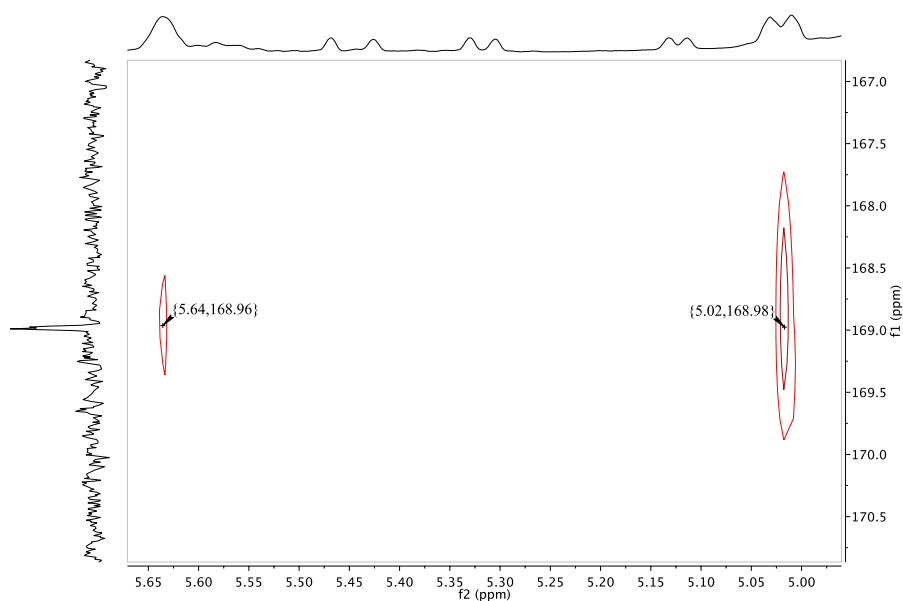


Figura 6. Correlación HMBC más importante del compuesto **3** en CD₃OD.

Tabla 5. Componentes necesarios para preparación de dieta artificial.

Agar Dieta	g/L	g/100 cm ³
Glucosa	50	5
Bactopeptona	10	1
Ext. de levadura	1	0,1
Agar Agar	15	1,5

Tabla 6. Diseño experimental usado en los bioensayos contra *A. cephalotes*.

Tratamiento	DMSO y CMC		Extractos de <i>T. diversifolia</i> a 1000 ppm		Comparación Ext. Diclorometano
	Ingestión	Contacto	Ingestión	Contacto	Ingestión
T1	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta
T2	Dieta + CMC 0.25%	CMC 0.125%	Dieta + C1	C2	Dieta + C1
T3	Dieta + CMC 0.5%	CMC 0.25%	Dieta + Td 1 en C1	Td 1 en C2	Dieta + Td 2.1 (250 ppm) en C1
T4	Dieta + DMSO 0.5%	DMSO 0.5%	Dieta + Td 2 en C1	Td 2 en C2	Dieta + Td 2.1 (500 ppm) en C1
T5	Dieta + DMSO 1%	DMSO 1%	Dieta + Td 2.1 en C1	Td 2.1 en C2	-
T6	Dieta + DMSO 3%	DMSO 3%	Dieta + Td 2.4 en C1	Td 2.4 en C2	-

C1: CMC a una concentración de 0.1666%, C2: CMC a una concentración de 0.125%.

Caracterización de derivados de ácido cafeico

Ácido (E)-3-(((3-(3,4-dihidroxifenil)acrilóil)oxi)metil)-2-metiloxirano-2-carboxílico (1).

Sólido amarillo; $[\alpha]_D^{25}$ -9.02 ($c=3.66 \times 10^{-5}$, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 290 (2.90), 320 (3.00) 325 (3.02); RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) y RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) ver tabla 3. [+] HPLC-MS m/z 295 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 313 $[\text{M}+\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^+$; [-] HPLC-MS m/z 293 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 339 $[\text{M}-\text{H}+\text{HCOOH}]^-$. Modo negativo HR-ESI-MS m/z 311.0780 (Calculado para $[\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_7-\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^-$, 311.0772).

Ácido 4,5-dicafeoilquinico (2). Sólido amarillo; $[\alpha]_D^{25}$ -2.30 ($c=4.66 \times 10^{-4}$, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 290 (2.07), 320 (2.22) 325 (2.26); RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 7.62 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7'), 7.55 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H-7''), 7.05 (1H, dd, $J=1.1$, 0.28 Hz, H-2''), 7.05 (1H, dd, $J=1.4$, 0.4 Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J=8.4$, 1.1 Hz, H-6''), 6.94 (1H, dd, $J=8.4$, 1.4 Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.78 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-5''), 6.31 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8'), 6.22 (1H, d, $J=16.1$ Hz, H-8''), 5.66 (1H, ddd, $J=9.7$, 9.5, 5.1 Hz, H-5), 5.15 (1H, dd, $J=9.5$, 3.1 Hz, H-4), 4.40 (1H, dd, $J=4.0$, 3.1 Hz, H-3), 2.33 (1H, dd, $J=14.1$, 3.1 Hz, H-2a), 2.30 (1H, m, H-6a), 2.25 (1H, dd, $J=13.3$, 9.7 Hz, H-6b), 2.13 (1H, dd, $J=14.1$, 4.0 Hz, H-2b). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 177.1 (C-7), 168.6 (C-9''), 168.25 (C-9'), 149.6 (C-4', C-4''), 147.7 (C-7''), 147.6 (C-7'), 146.8 (C-3', C-3''), 127.7 (C-1', C-1''), 123.1 (C-6', C-6''), 116.5 (C-5', C-5''), 115.19 (C-2''), 115.16 (C-2'), 114.8 (C-8''), 114.7 (C-8'), 76.2 (C-1), 75.9 (C-4), 69.5 (C-3), 69.0 (C-5), 39.5 (C-2), 38.4 (C-6). [+] HPLC-MS m/z 355 $[(\text{M}+\text{H})-162]^+$; 517 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 561 $[\text{M}+\text{HCOOH}]^+$; [-] HPLC-MS m/z 353 $[(\text{M}+\text{H})-162]^-$; 515 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 559 $[\text{M}+\text{HCOOH}]^-$. [-] HR-ESI-MS m/z 515.1212 (Calculado para $[\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_{12}]^-$, 515.1195).

Ácido 3,4-dicafeoilquinico (3): Sólido Amarillo; $[\alpha]_D^{25}$ -1.26 ($c=6.50 \times 10^{-4}$, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 290 (2.39), 320 (2.57) 325 (2.59); RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 7.57 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7''), 7.55 (1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, dd, $J=1.5$, 0.5 Hz, H-2''), 7.02 (1H, dd, $J=1.4$, 0.4 Hz, H-2'), 6.93 (1H, dd, $J=8.3$, 1.5 Hz, H-6''), 6.89 (1H, dd, $J=8.3$, 1.4 Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5''), 6.74 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'),

6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 6.27 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.66 (1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, H-3), 5.05 (1H, dd, $J = 9.5, 3.3$ Hz, H-4), 4.36 (1H, ftd, $J = 9.5, 4.3$ Hz, H-5), 2.34 (1H, dd, $J = 15.0, 3.8$ Hz, H-2a), 2.22 (1H, m, H-6a), 2.15 (1H, m, H-2b), 2.11 (1H, dd, $J = 13.7, 9.5$ Hz, H-6b). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 179.0 (C-7), 168.99 (C-9''), 168.98 (C-9'), 149.0 (C-4', C-4''), 147.5 (C-7', C-7''), 146.2 (C-3''), 146.17 (C-3'), 127.7 (C-1'), 127.59 (C-1''), 123.6 (C-6'), 123.4 (C-6''), 116.73 (C-5'), 116.66 (C-5''), 115.4 (C-8', C-8''), 115.2 (C-2'), 115.1 (C-2''), 77.4 (C-1), 76.22 (C-4), 70.1 (C-3), 65.8 (C-5), 41.3 (C-6), 36.8 (C-2). [–] HR-ESI-MS m/z 515.1209 (Calculado para $[\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_{12}]^-$, 515.1195).

Ácido 3,5-dicafeoilquinico (4): Sólido Amarillo; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +0.82$ ($c=3.38 \times 10^{-4}$, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 290 (4.17), 320 (4.38) 325 (4.40). RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 7.62 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7''), 7.08 (1H, dd, $J = 1.4, 0.4$ Hz, H-2'), 7.06 (1H, dd, $J = 1.4, 0.3$ Hz, H-2''), 6.97 (2H, dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, H-6', H-6''), 6.78 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5', H-5''), 6.38 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 6.29 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8''), 5.45 (1H, dd, $J = 5.9, 3.3$ Hz, H-3), 5.39 (1H, f dt, $J = 8.7, 3.5$ Hz, H-5), 3.95 (1H, f td, $J = 8.7, 3.3$ Hz, H-4), 2.28 (1H, ft, $J = 7.3$ Hz, H-2_{ax}), 2.12 (1H, m, H-2_{eq}), 2.17 (2H, m, H-6). [–] HR-ESI-MS m/z 515.1188 (Calculado para $[\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_{12}]^-$, 515.1195).

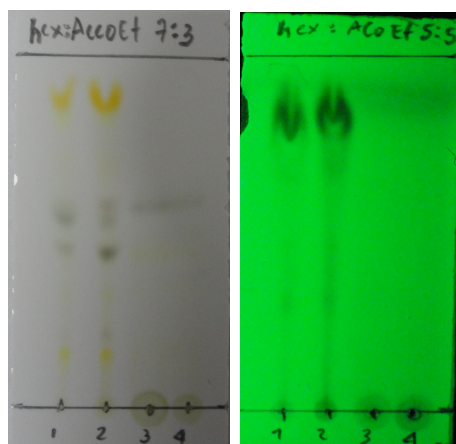
Ácido 3-O-cafeoilquinico (5) Sólido Amarillo; RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.36 (1H, dt, $J = 5.5, 3.3, 3.1$ Hz, H-3), 4.15 (1H, ddd, $J = 10.0, 8.5, 4.5$ Hz, H-5), 3.65 (1H, dd, $J = 8.5, 3.1$ Hz, H-4), 2.20 (1H, dd, $J = 14.3, 3.3$ Hz, H-2_{ax}), 2.15 (1H, m, H-2_{eq}), 2.13 (1H, ddd, $J = 14.0, 4.5, 0.8$ Hz, H-6_{eq}), 1.96 (dd, $J = 14.0, 10.0$ Hz, H-6_{ax}). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 178.4 (C-7), 169.0 (C-9'), 149.4 (C-4'), 146.80 (C-7'), 146.75 (C-3'), 128.0 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.5 (C-5'), 115.8 (C-8'), 115.1 (C-2'), 75.4 (C-1), 74.8 (C-4), 72.9 (C-3), 68.3 (C-5), 41.5 (C-6), 36.7 (C-2). [–] HR-ESI-MS m/z 353.0869 (Calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9]^-$, 353.0873).

Ácido 4-O-cafeoilquinico (6) Sólido Amarillo; RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 7.64 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.07 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.97 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.37 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 4.81 (1H, dd, $J = 9.1, 3.1$

Hz, H-4), 4.30 (1H, br dd, $J = 7.6, 2.7$ Hz, H-3), 4.28 (1H, ddd, $J = 10.9, 9.1, 4.6$ Hz, H-5), 2.21 (1H, ddd, $J = 13.5, 4.6, 2.9$ Hz, H-6_{eq}), 2.18 (1H, dd, $J = 14.5, 3.1$ Hz, H-2_{ax}), 2.07 (1H, ddd, $J = 14.5, 4.3, 2.9$ Hz, H-2_{eq}), 2.01 (1H, dd, $J = 13.5, 10.9$ Hz, H-6_{ax}). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 177.9 (C-7), 169.0 (C-9'), 149.5 (C-4'), 147.1 (C-7'), 146.8 (C-3'), 127.9 (C-1'), 123.0 (C-6'), 116.5 (C-5'), 115.4 (C-8'), 115.2 (C-2'), 79.2 (C-4), 77.0 (C-1), 69.6 (C-3), 65.8 (C-5), 42.5 (C-6), 38.6 (C-2).

Ácido 5-O-cafeoilquinico (7) Sólido Amarillo; RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 7.56 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.05 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.95 (1H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6'), 6.78 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.26 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.33 (1H, ddd, $J = 9.8, 8.2, 4.4$ Hz, H-5), 4.17 (1H, ddd, $J = 5.4, 3.3, 3.2$ Hz, H-3), 3.72 (1H, dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz, H-4), 2.23 (1H, ddd, $J = 13.5, 4.4, 2.5$ Hz, H-6_{eq}), 2.18 (1H, dd, $J = 14.1, 3.3$ Hz, H-2_{ax}), 2.08 (1H, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz, H-6_{ax}), 2.05 (1H, ddd, $J = 14.1, 5.4, 2.5$ Hz, H-2_{eq}). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD- d_4) δ ppm: 177.1 (C-7), 168.7 (C-9'), 149.6 (C-4'), 147.1 (C-7'), 146.8 (C-3'), 127.8 (C-1'), 122.9 (C-6'), 116.5 (C-5'), 115.3 (C-8'), 115.2 (C-2'), 76.2 (C-1), 73.5 (C-4), 72.0 (C-5), 71.3 (C-3), 38.8 (C-6), 38.2 (C-2). $[-]$ HR-ESI-MS m/z 353.0867 (Calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_9]^-$, 353.0873).

Imagen 1 CCD para extractos Td 2.1, Td 2.2, Td 2.3 y Td 2.4.

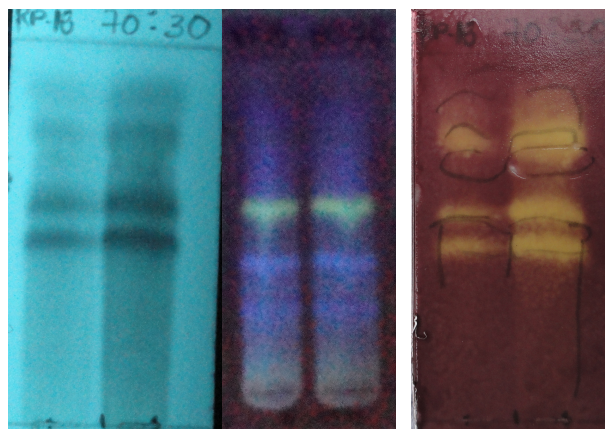


1= Td 2.1, 2= Td 2.2, 3= Td 2.3 y 4= Td 2.4.

Izquierda= revelado con luz visible

Derecha= revelado con UV 254 nm.

Imagen 2 CCD para extractos Td 2.3, Td 2.4.



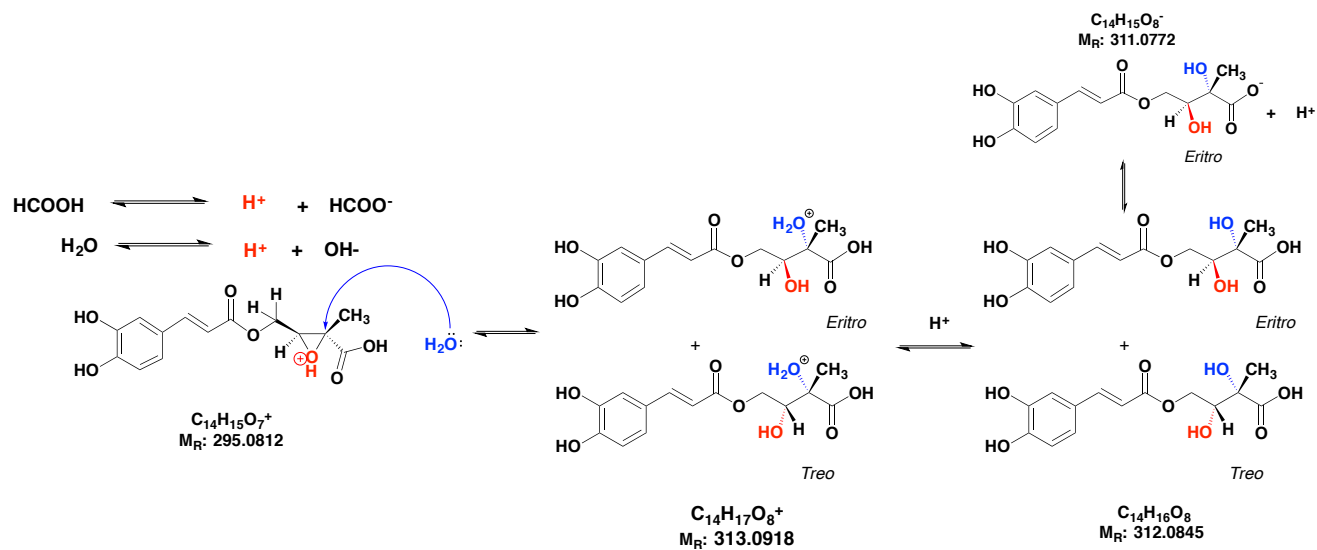
Td 2.3 Td 2.4

Izquierda= revelado con UV 254 nm.

Centro= revelado con UV 365 nm.

Derecha= revelado con DPPH.

Mecanismo de apertura de anillo epóxido en 1 por hidrólisis ácida.



CAPITULO 2. SÍNTESIS TOTAL Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ANÁLOGOS DE ACHYROFURANO

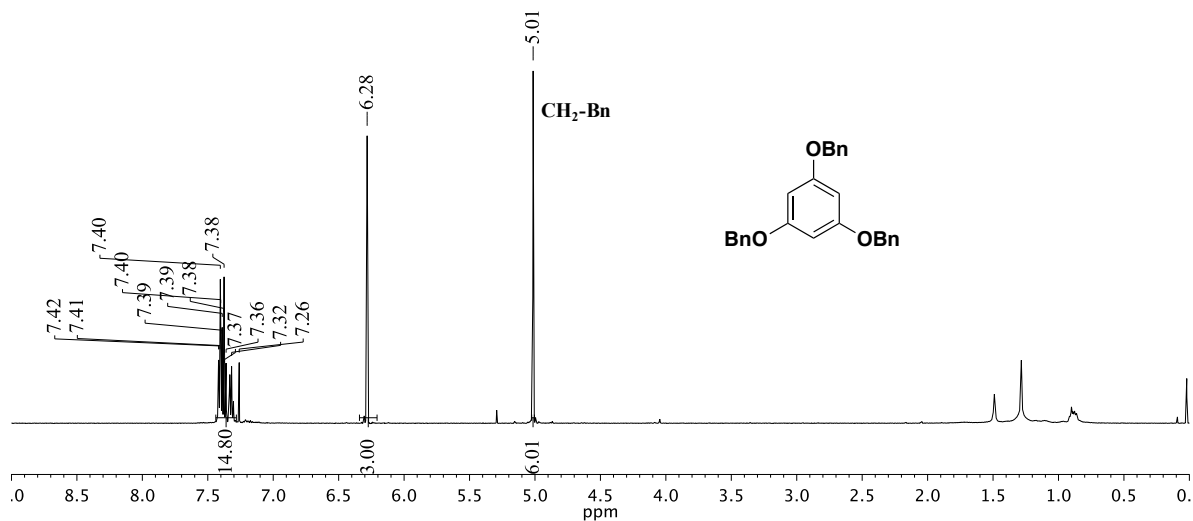


Figura 7. Espectro de RMN ¹H del compuesto **42**, tomado en CDCl₃.

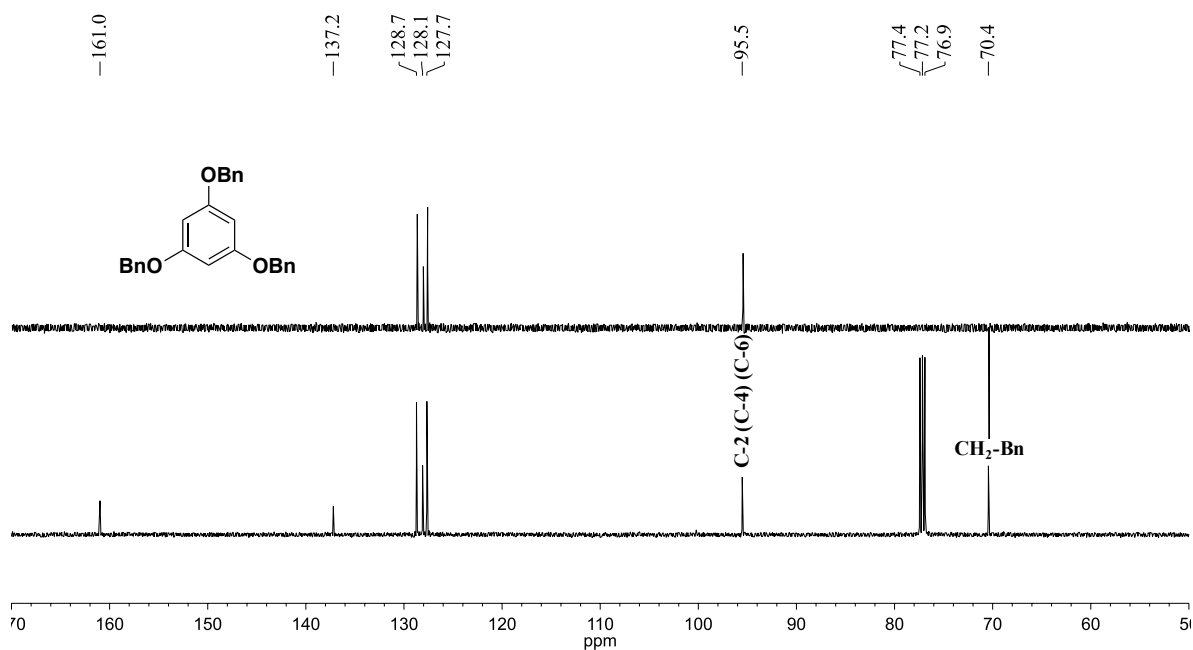
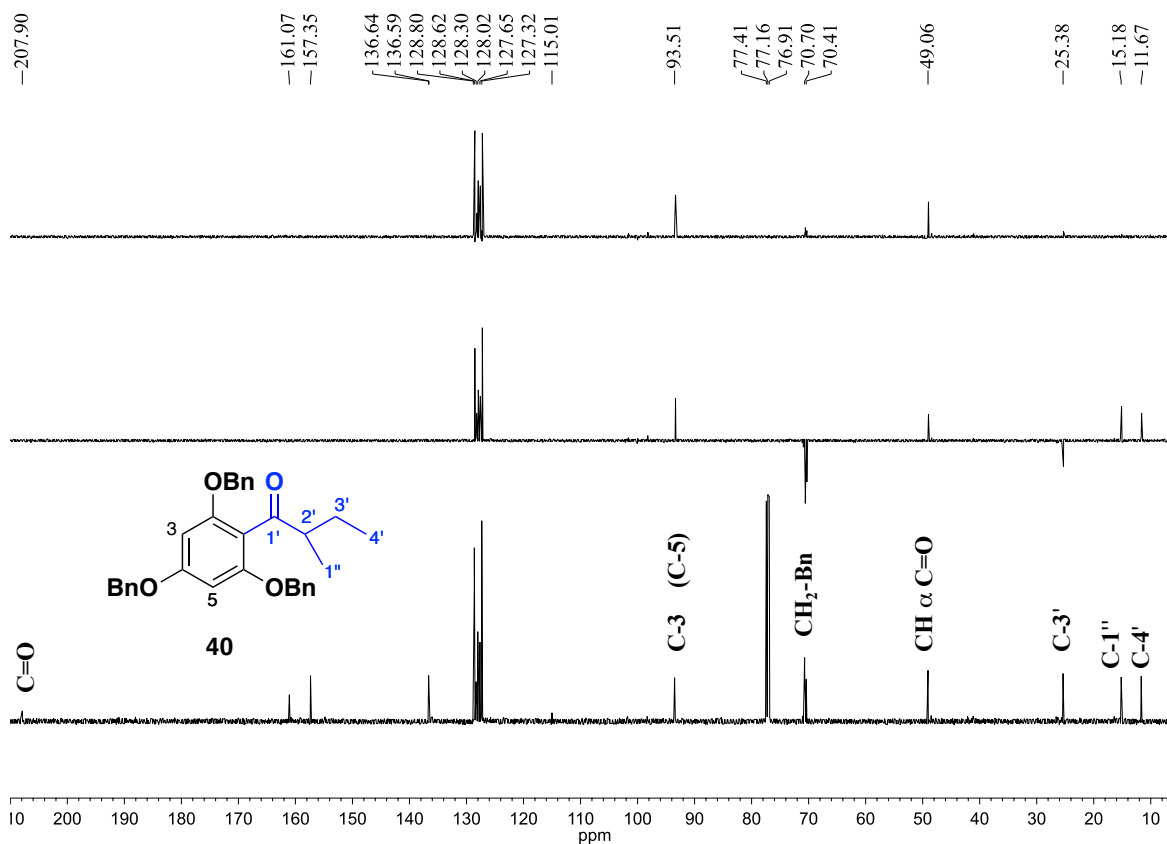
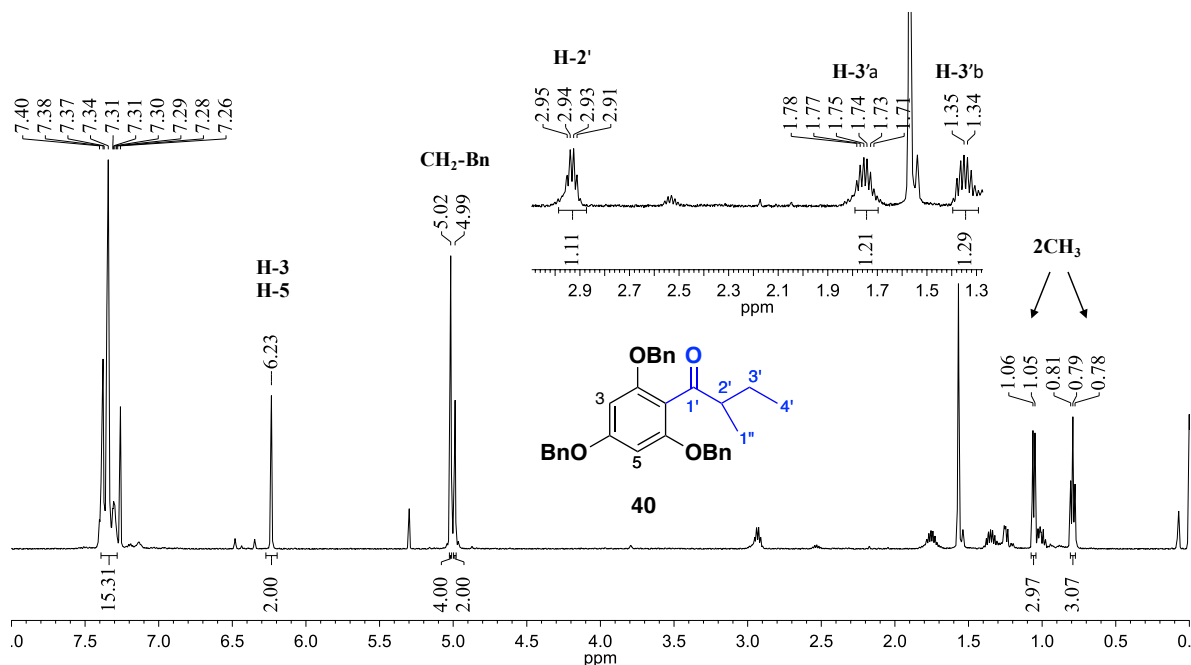


Figura 8. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **42**, tomado en CDCl₃.



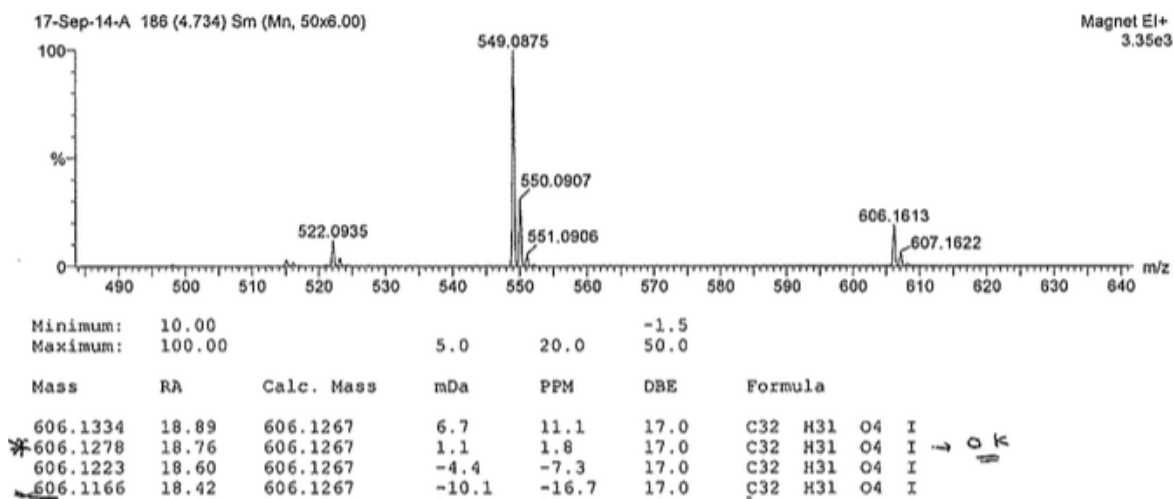


Figura 11. HR-EIMS del compuesto **36**.

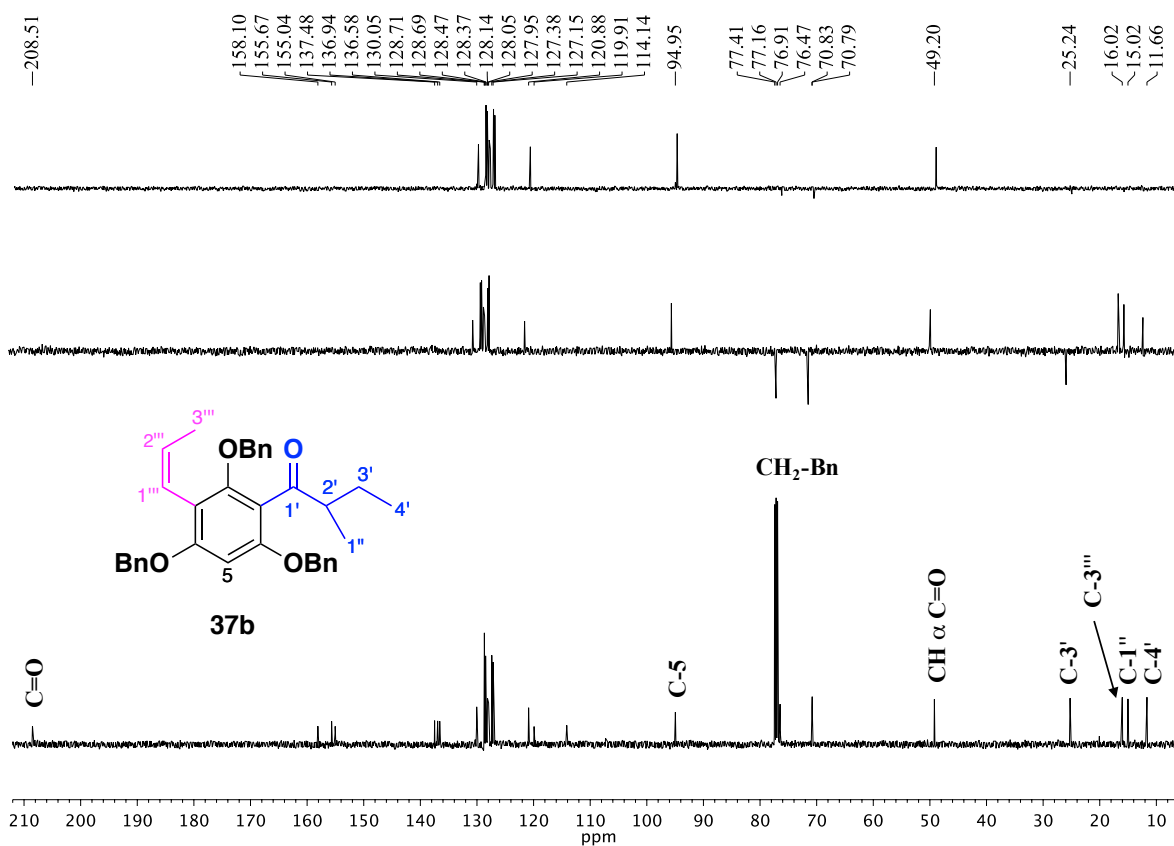


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C , DEPT 135 y DEPT 90 del compuesto **37b**, tomado en CDCl_3 .

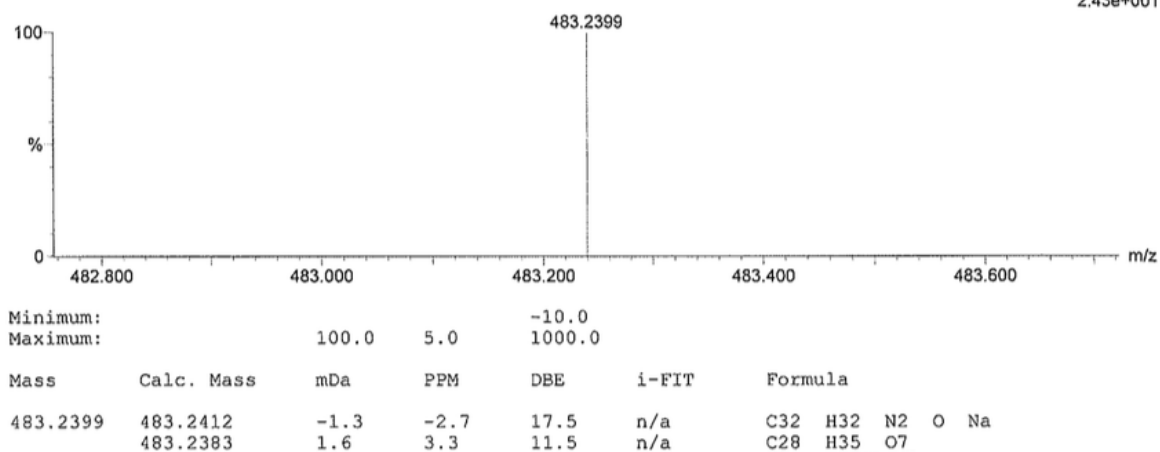


Figura 13. HR-EIMS del compuesto **39b**.

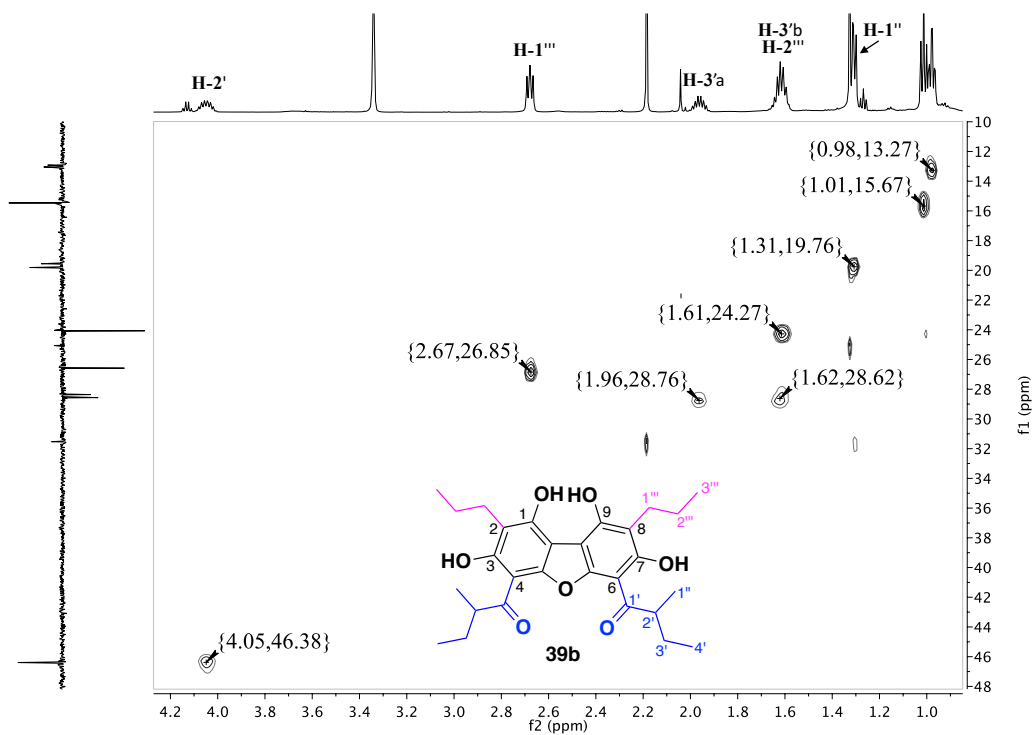


Figura 14. HSQC del dibenzofurano **39b** tomado en CD₃OD.

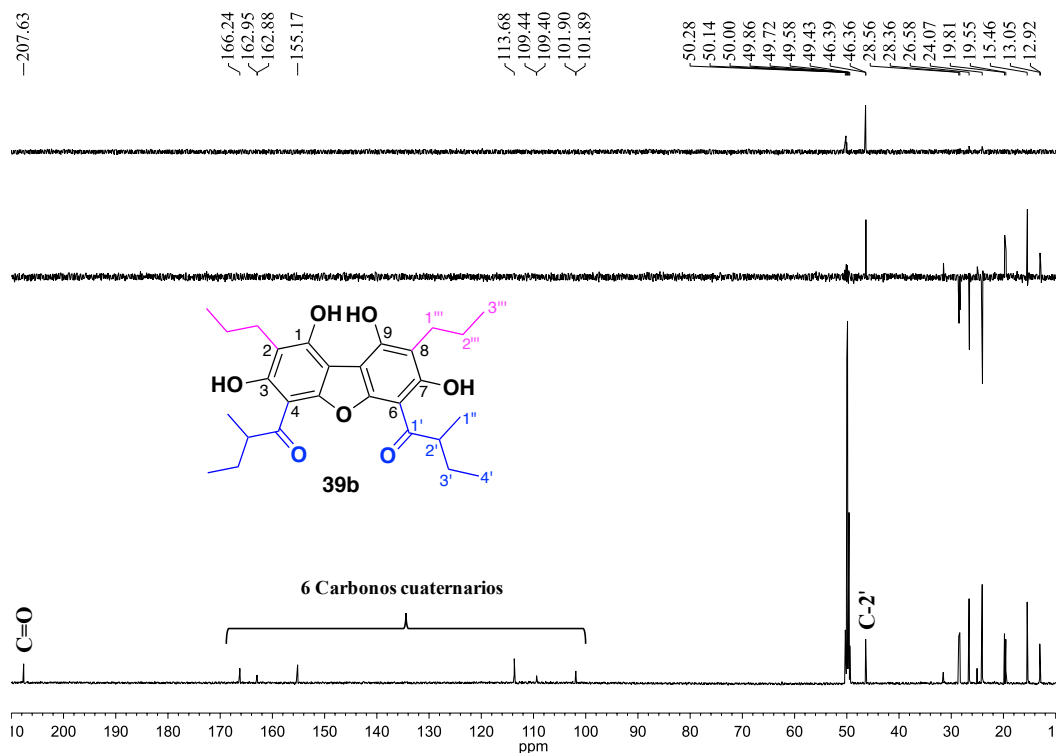
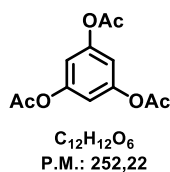
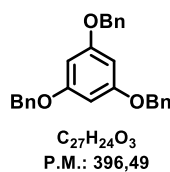


Figura 15. Comparación entre espectros RMN ^{13}C , DEPT-135 y DEPT-90 del dibenzofurano **39b**, tomados en CD_3OD .

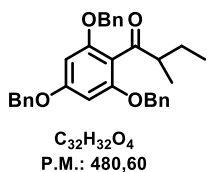
Caracterización de compuestos obtenidos



1,3,5-tri-tert-butylbenzene (43): Sólido Blanco. Rend.: 74%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 6.84 (3H, s), 2.27 (9H, s). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 168.3 (3CO), 151.3 (3C), 112.6 (3CH), 21.0 (3CH₃).

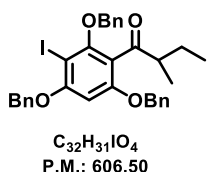


1,3,5-tris(benzyloxy)benzene (42) ¹⁵⁸: Sólido blanco. Rend.: 94%. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.57-7.27 (15H, m), 6.28 (3H, s), 5.01 (6H, s). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 160.8 (3C), 137.0 (3C), 128.6 (6CH), 127.9 (3CH), 127.5 (6CH), 95.4 (3CH), 70.3 (3CH₂).



2-metil-1-(2,4,6-tris(benciloxi)fenil)butan-1-ona (40): Sólido blanco.

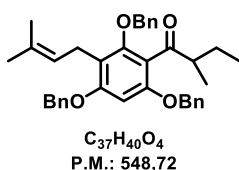
Rend.: 69%, P.f.: 72-73 °C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3032, 2965, 2930, 2873, 1693, 1602, 1497, 1454, 1431, 1376, 1203, 1152, 1117. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.41-7.27 (15H, m), 6.25 (2H, s), 5.02 (4H, s), 5.00 (2H, s), 2.95 (1H, m), 1.77 (1H, m), 1.36 (1H, m), 1.07 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.80 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 208.0 (C=O), 161.0 (C), 157.3 (2C), 136.6 (2C), 136.5 (C), 128.8 (2CH), 128.6 (4CH), 128.3 (CH), 128.0 (2CH), 127.7 (2CH), 127.3 (4CH), 114.9 (C), 93.4 (CH), 70.6 (2CH₂), 70.4 (CH₂), 49.1 (CH), 25.4 (CH₂), 15.2 (CH₃), 11.7 (CH₃). EIMS m/z 480 (M^+ , 1), 423 (62), 91 (100). HR-EIMS m/z 480.2293 (calculado para $C_{32}H_{32}O_4$; [M^+] 480.2301).



1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-iodofenil]-2-metilbutan-1-ona (36): Sólido amarillo pálido.

Rend.: 97%, P.f.: 126-127 °C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3063, 3032, 2966, 2932, 2874, 1694, 1582, 1453, 1403, 1362, 1184, 1101. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.54-7.30 (15H, m), 6.37 (1H, s), 5.12 (2H, s), 5.02 (2H, s), 5.00 (1H, d, $J = 9.8$ Hz), 4.95 (1H, d, $J = 9.9$ Hz), 2.89 (1H, m), 1.73 (1H, m), 1.34 (1H, m), 1.05 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.79 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 207.6 (C=O), 159.4 (C), 157.6 (C), 156.6 (C), 136.6 (C), 136.1 (C), 136.0 (C), 128.77 (3CH), 128.76 (3CH), 128.4 (2CH), 128.36 (CH), 128.29 (CH), 128.2 (CH), 127.4 (2CH), 127.1 (2CH), 120.9 (C), 95.5 (CH), 77.4 (CH₂), 75.4 (C), 71.4 (CH₂), 71.0 (CH₂), 49.0 (CH), 25.1 (CH₂), 14.9 (CH₃), 11.6 (CH₃). EIMS m/z 606 (M^+ , 6), 549 (26), 331 (6), 91 (100). HR-EIMS m/z 606.1278 (calculado para $C_{32}H_{31}IO_4$, [M^+] 606.1267).

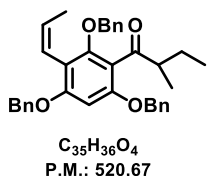
2.4.3.1 Caracterización de derivados de acilfloroglucinol



2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(3-metilbut-2-enil)fenil]butan-1-ona (37a): Sólido blanco.

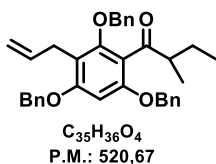
P.f.: 78-79 °C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3032, 2965, 2928, 2874, 1691, 1594, 1454, 1373, 1220, 1166, 1096, 802. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.40-7.31 (15H, m), 6.38 (1H, s), 5.19 (1H, t, $J = 6.6$ Hz), 5.04 (2H, s), 5.01 (2H, s), 4.88 (1H, d, $J = 10.7$ Hz), 4.85 (1H, d, $J = 10.7$ Hz), 3.35 (2H, d, $J = 6.5$ Hz), 2.94 (1H, m), 1.75 (1H, m), 1.67 (3H, s), 1.58 (3H, s),

1.35 (1H, m), 1.07 (3H, d, $J = 7.1$ Hz), 0.82 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 208.9 (C=O), 158.8 (C), 155.1 (C), 154.9 (C), 137.5 (C), 136.9 (C), 136.8 (C), 131.5 (C), 128.7 (4CH), 128.5 (2CH), 128.11 (CH), 128.29 (CH), 128.08 (CH), 128.06 (CH), 128.0 (CH), 127.40 (2CH), 127.39 (2CH), 123.5 (CH), 119.8 (C), 117.5 (C), 94.9 (CH), 78.0 (CH_2), 71.0 (CH_2), 70.5 (CH_2), 49.2 (CH), 25.8 (CH_3), 25.3 (CH_2), 23.0 (CH_2), 18.0 (CH_3), 15.0 (CH_3), 11.7 (CH_3). EIMS m/z 548 (M^+ , 1), 491 (6), 423 (2), 373 (2), 333 (5), 91 (100). HR-EIMS m/z 548.2904 (calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{O}_4$; $[\text{M}^+]$ 548.2927).



2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(2-(Z)-propenil)fenil]butan-1-ona

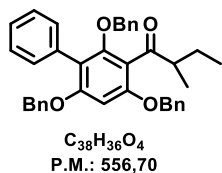
(37b): Sólido blanco. P.f.: 109-110 °C. IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}): 3665, 2969, 2933, 1696, 1594, 1458, 1367, 1219, 1106. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.40-7.28 (15H, m), 6.38 (1H, s), 6.32 (1H, d, $J = 11.1$ Hz), 5.90 (1H, m), 5.04 (2H, s), 5.01 (2H, s), 4.79 (1H, d, $J = 10.1$ Hz), 4.76 (1H, d, $J = 10.3$ Hz), 2.91 (1H, m), 1.76 (1H, m), 1.59 (3H, dd, $J = 6.8, 1.6$ Hz), 1.35 (1H, m), 1.06 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.80 (3H, t, $J = 7.5$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 208.5 (C=O), 158.1 (C), 155.7 (C), 155.0 (C), 137.5 (C), 136.9 (C), 136.6 (C), 130.0 (CH), 128.71 (2CH), 128.69 (2CH), 128.5 (2CH), 128.4 (2CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.4 (2CH), 127.1 (2CH), 120.9 (CH), 119.9 (C), 114.1 (C), 95.0 (CH), 76.5 (CH_2), 70.83 (CH_2), 70.79 (CH_2), 49.2 (CH), 25.2 (CH_2), 16.0 (CH_3), 15.0 (CH_3), 11.7 (CH_3) ppm. MS (EI) m/z 520 (M^+ , 2), 462 (4), 429 (2), 345 (5), 181 (4), 91 (100). HR-EIMS m/z 520.2640 (calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{O}_4$, $[\text{M}^+]$ 520.2614).



2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(2-alil)fenil]butan-1-ona **(37g):**

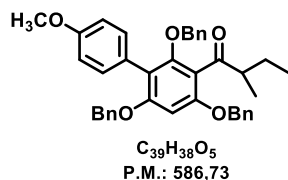
Aceite incoloro. IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}): 3672, 3650, 2964, 2927, 2857, 1739, 1698, 1598, 1459, 1425, 1378, 1264, 1222, 1031, 805. RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.40 - 7.31 (15H, m), 6.39 (1H, s), 6.00 (1H, m), 5.04 (2H, s), 5.02 (2H, s), 4.98 (1H, d, $J = 10.3, 1.5$ Hz), 4.96 (1H, d, $J = 17.4, 1.7$ Hz), 4.89 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), 4.86 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), 3.42 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 2.92 (1H, m), 1.75 (1H, m), 1.34 (1H, m), 1.06 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.81 (3H, t, $J = 7.5$ Hz). RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) δ ppm: 208.8 (C=O), 158.8 (C), 155.4 (C), 155.2 (C), 137.5 (C), 137.2 (CH), 136.9 (C), 136.7 (C), 128.74 (CH), 128.72 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 128.0

(CH), 127.4 (CH), 127.2 (CH), 119.9 (C), 115.5 (C), 114.9 (CH₂), 94.9 (CH), 78.0 (CH₂), 71.0 (CH₂), 70.5 (CH₂), 49.2 (CH), 28.1 (CH₂), 25.3 (CH₂), 15.0 (CH₃), 11.7 (CH₃). MS (IE) m/z 520 (M^+ , 2); 463 (17); 429 (3); 345 (2); 333 (1); 91 (100). HR-MS m/z 520.2633 (calculado para C₃₅H₃₆O₄, [M^+] 520.2614).



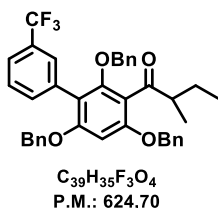
2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-fenil)fenil]butan-1-ona (37c):

Sólido blanco. P.f.: 75-76 °C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹): 3062, 3031, 2965, 2931, 2874, 1693, 1592, 1453, 1413, 1366, 1321, 1172, 1144, 1100, 1072. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.48 - 7.27 (13H, m), 7.21 - 7.19 (5H, m), 6.85 (1H, d), 6.84 (1H, d), 6.45 (1H, s), 5.04 (2H, s), 4.99 (2H, s), 4.39 (2H, s), 2.95 (1H, m), 1.79 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.09 (3H, d, J = 6.98 Hz), 0.83 (3H, t, J = 7.43 Hz). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ ppm: 208.4 (C=O), 157.8 (C), 155.9 (C), 155.0 (C), 136.9 (C), 136.8 (C), 136.6 (C), 133.6 (C), 131.4 (CH), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.4 (CH), 127.2 (CH), 126.8 (CH), 120.4 (C), 119.2 (C), 95.8 (CH), 76.7 (CH₂), 70.93 (CH₂), 70.90 (CH₂), 49.2 (CH), 25.2 (CH₂), 15.0 (CH₃), 11.6 (CH₃). MS (IE) m/z : 556 (M^+ , 2); 499 (22); 409 (2); 319 (1); 91 (100). HR-EIMS m/z 556.2620 (calculado para C₃₈H₃₆O₄, [M^+] 556.2614).



2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-(4'-metoxi)fenil)fenil]butan-1-ona (37d):

Sólido blanco. P.f.: 132-133 °C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹): 3030, 2962, 2929, 2872, 1693, 1591, 1454, 1366, 1244, 1174, 1144, 1098, 1074, 1031, 805. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.40 - 7.27 (11H, m), 7.23 - 7.20 (4H, m), 6.95 (2H, d, J = 8.7 Hz), 6.91 (2H, dd, J = 6.76 Hz), 6.43 (1H, s), 5.03 (2H, s), 4.98 (2H, s), 4.39 (2H, s), 3.86 (3H, s, OCH₃), 2.93 (1H, m), 1.79 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.08 (3H, d, J = 6.96 Hz), 0.82 (3H, t, J = 7.42 Hz). RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ ppm: 208.5 (C=O), 158.8 (C), 157.9 (C), 155.6 (C), 155.1 (C), 136.94 (C), 136.90 (C), 136.6 (C), 132.4 (CH), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.19 (CH), 128.17 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 127.4 (CH), 126.8 (CH), 125.6 (C), 120.3 (C), 118.6 (C), 113.6 (CH), 95.7 (CH), 76.5 (CH₂), 70.9 (CH₂), 70.8 (CH₂), 55.4 (OCH₃), 49.2 (CH), 25.2 (CH₂), 15.0 (CH₃), 11.7 (CH₃). MS (IE) m/z 586 (M^+ , 6); 529 (11); 439 (2); 423 (4); 320 (2); 91 (100). HR-EIMS m/z 586.2714 (calculado para C₃₉H₃₈O₅, [M^+] 586.2719).



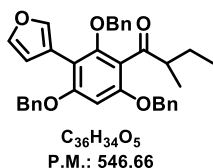
2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(1-(4'-trifluorometil)fenil)fenil]

butan-1-ona (37e): Sólido blanco. P.f.: 116.3 - 119.2°C. IR (NaCl) ν_{\max}

(cm^{-1}): 3032, 2967, 2931, 2875, 1693, 1594, 1455, 1367, 1331, 1257,

1168, 1146, 1121, 1075, 906, 807. RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ ppm:

7.75 (1H, s), 7.64 (1H, d, $J = 7.62$ Hz), 7.58 (1H, d, $J = 7.87$ Hz), 7.48 (1H, t, $J = 7.76$ Hz), 7.40- 7.18 (13H, m), 6.85 (2H, dd, $J = 7.52, 1.91$ Hz), 6.49 (1H, s), 5.09 (2H, s), 4.99 (2H, s), 4.40 (2H, s), 2.96 (1H, m), 1.80 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.11 (3H, d, $J = 6.95$ Hz), 0.85 (3H, t, $J = 7.48$ Hz). RMN ^{13}C (151 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 208.2 (C=O), 157.6 (C), 156.5 (C), 154.9 (C), 136.36 (C), 136.34 (C), 134.9 (CH), 134.2 (C), 130.3 (C, d, $J = 33.2$ Hz), 124.4 (C, d, $J = 271.8$ Hz), 128.8 (CH), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.31 (CH), 128.25 (CH), 128.12 (CH), 128.08 (CH), 127.4 (CH), 126.9 (CH), 123.9 (CH, d, $J = 3.0$ Hz), 120.3 (C), 117.3 (C), 95.3 (CH), 77.1 (CH_2), 70.9 (CH_2), 70.8 (CH_2), 49.2 (CH), 25.2 (CH_2), 15.0 (CH_3), 11.7 (CH_3). MS (IE) m/z 624 (M^+ , 3); 567 (43); 540 (2); 271 (1); 181 (8); 91 (100). HR-EIMS m/z 624.2499 (calculado para $C_{39}H_{35}O_4F_3$, [M^+] 624.2487).



2-metil-1-[2,4,6-tris(benciloxi)-3-(3-furanil)fenil]butan-1-ona (37f):

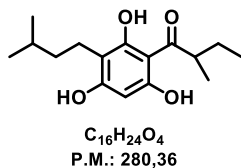
Aceite incoloro. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3715, 3675, 3035, 2968, 2933,

2878, 1967, 1595, 1458, 1375, 1180, 1159, 1102, 1029, 807. RMN 1H (500

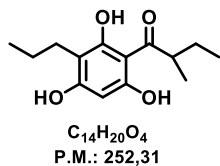
MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7.76 (1H, dd, $J = 1.41, 0.605$ Hz), 7.44 (1H, t, $J =$

1.73 Hz), 7.40 - 7.28 (13H, m), 7.22 - 7.20 (2H, m), 6.84 (1H, dd, $J = 1.68, 0.565$ Hz), 6.45 (1H, s), 5.05 (4H, s), 4.64 (1H, d, $J = 9.99$ Hz), 4.60 (1H, d, $J = 9.90$ Hz), 2.94 (1H, m), 1.79 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.09 (3H, d, $J = 6.98$ Hz), 0.83 (3H, t, $J = 7.45$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 208.3 (C=O), 157.9 (C), 155.5 (C), 155.0 (C), 142.7 (CH), 141.7 (CH), 137.0 (C), 136.6 (C), 136.5 (C), 128.80 (CH), 128.75 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.24 (CH), 128.22 (CH), 128.1 (CH), 127.42 (CH), 127.37 (CH), 120.6 (C), 116.2 (C), 112.5 (CH), 109.9 (C), 95.5 (CH), 76.4 (CH_2), 71.1 (CH_2), 70.9 (CH_2), 49.3 (CH), 25.2 (CH_2), 15.0 (CH_3), 11.7 (CH_3). MS (IE) m/z 586 (M^+ , 3); 489 (4); 423 (1); 91 (100). HR-EIMS m/z 546.2405 (calculado para $C_{36}H_{34}O_5$, [M^+] 546.2406).

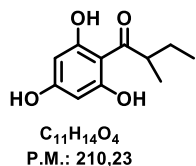
2.4.3.2 Caracterización de acilfloroglucinoles



2-metil-1-(2,4,6-trihidroxi-3-isopentilfenil)butan-1-ona (38a): Sólido amarillo. Rend.: 85%, P.f.: 163-165 °C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3389, 2958, 2933, 2870, 1629, 1606, 1572, 1515, 1437, 1370, 1219, 1117, 1058, 815. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ ppm: 12.34 (1H, br s), 7.75 (1H, br s), 5.82 (1H, s), 5.72 (1H, br s), 3.74 (1H, m), 2.53 (2H, m), 1.83 (1H, m), 1.61 (1H, m), 1.43-1.35 (3H, m), 1.16 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.95 (6H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.91 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ ppm: 210.6 (C=O), 159.8 (C), 158.9 (C), 108.34 (C), 108.33 (C), 104.7 (C), 95.0 (CH), 46.1 (CH), 38.2 (CH_2), 28.4 (CH), 27.1 (CH_2), 22.7 (2 CH_3), 20.4 (CH_2), 16.8 (CH_3), 12.2 (CH_3). [+] HR-ESI-MS m/z 303.1574 (calculado para $C_{16}H_{24}O_4\text{Na}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 303.1572).

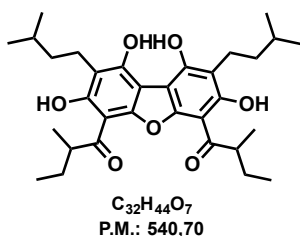


2-metil-1-(2,4,6-trihidroxi-3-propilfenil)butan-1-ona (38b): Sólido amarillo. Rend.: 96%, P.f.: 157-158°C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3378, 2966, 2936, 2876, 1631, 1611, 1519, 1441, 1379, 1230, 1142, 1115, 1061, 1018, 818. RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) δ ppm: 13.48 (1H, br s), 9.32 (1H, br s), 8.19 (1H, br s), 5.79 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 3.81 (1H, m), 2.49 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 1.80 (1H, m), 1.50 (2H, m), 1.37 (1H, m), 1.13 (3H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.93 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 0.88 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ ppm: 211.0 (C=O), 164.0 (C), 161.4 (C), 159.6 (C), 108.1 (C), 104.5 (C), 94.4 (CH), 45.8 (CH), 27.1 (CH_2), 24.4 (CH_2), 22.3 (CH_2), 16.8 (CH_3), 14.2 (CH_3), 12.0 (CH_3). [+] HR-ESI-MS m/z 251.1281 (calculado para $C_{14}H_{19}O_4$, $[\text{M}-1]^+$ 251.1283).

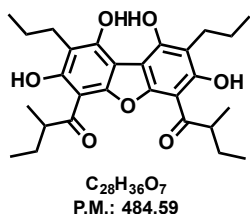


2-metil-1-(2,4,6-trihidroxifenil)butan-1-ona (46): Aceite amarillo. Rend.: 72%. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3324, 3306, 2968, 1630, 1602, 1458, 1376, 1222, 1089, 1065, 825. RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ ppm: 5.81 (s, 2H), 3.85 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ ppm: 212.3 (C=O), 166.7 (C), 166.6 (2C), 106.1 (C), 96.7 (2CH), 47.5 (CH), 28.9 (CH_2), 18.0 (CH_3), 13.2 (CH_3). HR-EIMS m/z 209.0806 (calculado para $C_{11}H_{13}O_4$, $[\text{M}-1]^+$ 209.0814).

2.4.3.3 Caracterización de dibenzofuranos acil polioxigenados



1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxi-2,8-diisopentildibenzo[b,d]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona) (39a): Sólido amarillo. P.f.: 157-158°C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3309, 2957, 1613, 1572, 1413, 1357, 1215, 1186, 1059, 751. RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) δ ppm: 3.91 (2H, m), 2.62 (4H, m), 1.87 (2H, m), 1.62 (2H, m), 1.44-1.36 (6H, m), 1.15 (6H, d, $J = 6.7$ Hz), 0.96 (12H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.91 (6H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) δ ppm: 213.1 (2C=O), 166.2 (2C), 163.4 (2C), 161.4 (2C), 110.92 (2C), 107.1 (2C), 97.8 (2C), 47.98 (CH), 47.97 (CH), 40.1 (2CH₂), 30.4 (2CH), 29.02 (CH₂), 28.99 (CH₂), 24.0 (4CH₃), 22.8 (2CH₂), 18.14 (CH₃), 18.10 (CH₃), 13.2 (2CH₃). [$+$] HR-ESI-MS m/z 539.3001 [$M-1$] $^+$ (calculado para $C_{32}H_{43}O_7$, 539.3009).



1,1'-(1,3,7,9-tetrahidroxi-2,8-dipropildibenzo[b,d]furan-4,6-diil)bis(2-metilbutan-1-ona) (39b): Sólido amarillo. Rend.: 6%, P.f.: 157-158°C. IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}): 3266, 2962, 2931, 1613, 1366, 1231, 1186, 1055, 704. RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) δ ppm: 4.05 (2H, m), 2.68 (4H, t, $J = 7.8$ Hz), 1.95 (2H, m), 1.65-1.60 (6H, m), 1.31 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.30 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.00 (6H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.97 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 0.96 (3H, t, $J = 7.4$ Hz). RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) δ ppm: 207.6 (2C=O), 166.2 (2C), 162.95 (C), 162.88 (C), 155.2 (2C), 113.7 (2C), 109.44 (C), 109.40 (C), 101.90 (C), 101.89 (C), 46.39 (CH), 46.36 (CH), 28.6 (CH₂), 28.4 (CH₂), 26.6 (2CH₂), 24.1 (2CH₂), 19.8 (CH₃), 19.6 (CH₃), 15.5 (2CH₃), 13.0 (CH₃), 12.9 (CH₃). [$-$] HR-ESI-MS m/z (ES $^-$) m/z : 483.2399 [$M^+ - 1$] $^-$ (calculado para $C_{28}H_{35}O_7$, 483.2383).